

***Molécules de ciblage et de libération de composés thérapeutiques  
et leur utilisation.***

5

**DOMAINE TECHNIQUE**

La présente invention se rapporte à des molécules chimères permettant le ciblage et la libération de composés thérapeutiques chez des mammifères, notamment des humains. Les molécules de l'invention comprennent principalement trois segments ou domaines  
10 fonctionnels : un segment de ciblage, capable de se lier préférentiellement à la surface des cellules ciblées, un segment thérapeutique, comprenant le composé biologiquement actif, et un segment de liaison entre le segment de ciblage et le segment thérapeutique, le segment de liaison étant clivable sur le site cible. L'invention concerne également la préparation de ces molécules, des intermédiaires de synthèse ou domaines de celles-ci, des  
15 compositions pharmaceutiques les contenant, et leurs utilisations, en particulier dans le domaine pharmaceutique. Les molécules et compositions de l'invention sont tout particulièrement adaptées au ciblage de cellules pathologiques engagées dans une voie apoptotique, et au traitement de pathologies ou tissus associés, notamment les cancers et l'inflammation.

20

**ETAT DE LA TECHNIQUE**

Les composés anti-tumoraux sont par principe des composés hautement cytotoxiques, qui sont distribués dans l'ensemble de l'organisme lorsqu'ils sont administrés de façon  
25 systémique. Ils produisent des réactions secondaires extrêmement préjudiciables à l'individu. Il y a donc un très grand intérêt à ne distribuer ces composés anti-tumoraux que dans les tissus tumoraux, c'est-à-dire à cibler ces tissus grâce à un vecteur spécifique. Bien que ce problème de toxicité des traitements soit particulièrement aiguë pour le cancer, il est généralisable à un grand nombre de traitements dans lesquels, de façon générale, un  
30 minimum d'effet secondaire est recherché pour un effet thérapeutique maximal.

Différents vecteurs ont été proposés et notamment des anticorps monoclonaux dirigés contre des marqueurs spécifiques de la surface des cellules cancéreuses. Ils produisent de

fait des effets cytotoxiques sur les cellules tumorales, mais l'amplitude de ces effets peut diminuer au cours du temps.

Un système appelé ADEPT (Antibody Directed Enzyme Prodrug Therapy) consiste en une  
5 thérapie dans laquelle un anticorps véhicule une enzyme au site tumoral. Ensuite, une pro-  
drogue est administrée et convertie en molécule active par cette enzyme (US 5,760,072 ;  
US 5,433,955). Dans cette méthode, seule l'enzyme permettant l'activation de la pro-  
drogue fait l'objet d'un ciblage. La pro-drogue est donc distribuée dans l'ensemble de  
10 l'organisme, ce qui n'exclut pas entièrement les réactions secondaires et diminue la dose  
de pro-drogue effectivement fournie au site tumoral. En outre, cette approche est complexe  
car requiert l'utilisation de plusieurs types de molécules. Une méthode analogue basée sur  
le ciblage de l'enzyme capable d'activer la pro-drogue a été décrite dans les demandes  
(WO97/26918 ; WO 98/51787).

15 D'autre part, divers systèmes de liaison pour la fabrication de pro-drogues, avec une  
possibilité de ciblage, ont été décrits : par exemple, on trouve des liaisons sulfonamides  
(WO98/00173), des liaisons clivables par la cathepsine B (WO98/56425) et des liaisons  
cinnamates (US20020187992).

20 Cependant, il existe toujours un fort besoin de molécules ou approches thérapeutiques non-  
toxiques permettant un ciblage ainsi qu'une activation spécifique d'une pro-drogue à un  
site pathologique. Ce système permettrait de réduire la dose d'agent actif, d'améliorer  
l'efficacité, et de diminuer les effets secondaires.

25

## EXPOSE DE L'INVENTION

L'objet de la présente invention est de fournir des molécules capables de cibler des tissus  
présentant une pathologie et d'y libérer de façon spécifique des composés aux propriétés  
thérapeutiques pour cette pathologie. Grâce aux molécules de l'invention, les composés  
30 thérapeutiques exercent leur activité de manière localisée et plus efficace, et offrent des  
risques d'effets secondaires bien inférieurs.

Les molécules de l'invention peuvent être construites pour cibler différents types de  
cellules ou de tissus pathologiques, de préférence chez l'homme. Dans un mode préféré de

mise en oeuvre, l'invention est basée sur le ciblage de cellules apoptotiques, grâce à un élément de ciblage ayant la propriété de se lier aux membranes cellulaires exprimant un lipide chargé négativement, en particulier la phosphatidylsérine (PS). L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est un phénomène physiologique normal, caractéristique des organismes multicellulaires et présent en particulier chez l'homme. Dans les conditions normales, le taux d'apoptose est cependant faible et les cellules apoptotiques sont très vite phagocytées soit par les cellules voisines, soit le plus souvent par les cellules phagocytaires professionnelles comme les macrophages ou les cellules dendritiques. En outre, les sites apoptotiques sont souvent très dispersés et ne présentent aucune synchronisation. De ce fait, l'apoptose physiologique est généralement indétectable.

L'apoptose est signalée aux cellules phagocytaires par la présence de PS à la surface des cellules apoptotiques, résultant de la perte de l'asymétrie de leur membrane plasmique. La présence d'apoptose détectable est le signe d'un désordre physiologique où les fonctions phagocytaires sont débordées et incapables de faire face à l'accroissement des cellules à éliminer. Des exemples bien connus de tels désordres sont par exemple l'apoptose du muscle cardiaque après un infarctus ou l'apoptose hépatique à la suite d'une infection virale forte ou d'autres affections à caractère aigu. Des cellules en apoptose sont également présentes dans d'autres tissus ou mécanismes pathologiques, tels que l'inflammation et le cancer.

D'autre part, lorsque le tissu pathologique contient peu ou pas suffisamment de cellules cibles capables de retenir massivement les molécules thérapeutiques de l'invention, celles-ci peuvent être utilisées en combinaison avec un agent ou un traitement causant ou favorisant l'apoptose au sein du tissu pathologique afin d'augmenter le bénéfice thérapeutique. Par exemple, certains tissu cancéreux « jeune » (e.g., de petite taille ou non-métastasés) ne contiennent pas toujours une quantité importante de cellules en apoptose, compte tenu de leur division rapide. Dans ce cas, un agent favorisant l'apoptose (par exemple un anti-tumoral classique) peut être utilisé en combinaison avec les molécules de l'invention, du moins au début du traitement, pour augmenter l'efficacité thérapeutique.

L'avantage de cibler les cellules apoptotiques de l'environnement tumoral, plutôt que de cibler des marqueurs spécifiques de la surface des cellules tumorales (par exemple, grâce à des anticorps monoclonaux), réside dans l'effet cinétique lié à l'administration du composé

anti-tumoral : dans le premier cas, l'action du composé thérapeutique, s'il est administré de façon continue, produit une augmentation de la « cible » et donc de la concentration effective dudit composé thérapeutique dans l'environnement tumoral alors que, dans le second cas, la taille de la « cible » a tendance à diminuer ainsi que la concentration effective du composé thérapeutique. Cet effet cumulatif résultant du ciblage des cellules apoptotiques est également très important pour le contrôle des étapes initiales de la métastase en maintenant une concentration optimale du composé thérapeutique dans les phases finales de régression de la tumeur. La diminution forte de la dose effective de composé anti-tumoral et sa forte localisation dans la région tumorale a bien sur aussi pour effet de réduire considérablement les effets toxiques secondaires sur le patient.

Les molécules de l'invention permettent donc de cibler différents tissus pathologiques et d'y libérer un agent thérapeutique ou biologiquement actif *in situ*, réduisant ainsi leur effets cytotoxiques indésirables sur les tissus sains.

Un premier objet de l'invention réside donc dans des molécules chimères comprenant une région de ciblage, une région active et une région de liaison sensible à l'environnement d'un tissu ou d'une cellule pathologique. La région de ciblage est préférentiellement une région ciblant les cellules en apoptose. La région active peut être tout composé thérapeutique, typiquement anti-cancéreux ou anti-inflammatoire. Le composé thérapeutique est typiquement moins actif lorsqu'il est dans la forme d'une molécule chimère de l'invention, que sous une forme libre.

Un autre objet de l'invention concerne une composition pharmaceutique comprenant une molécule chimère telle que définie ci-avant.

Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation des molécules de ciblage telles que définies ci-avant pour la préparation de médicaments. Dans un mode préféré de réalisation, ces médicaments sont des médicaments anti-tumoraux ou anti-inflammatoires. L'invention est utilisable notamment pour le traitement de tumeurs solides ou liquides ou hématopoiétiques, en particulier de cancers du sein, du poumon, de l'intestin, du colon, de la prostate, du cerveau, tête-et-cou, du foie, de la peau, le lymphome, le mélanome, etc. Lorsque le composé thérapeutique est un anti-inflammatoire, les molécules selon l'invention peuvent être utilisées pour la préparation de médicaments destinés au

traitement de pathologies inflammatoires aiguës ou chroniques comme l'asthme, la rectocolite hémorragique, la maladie de Crohn, le choc septique, les maladies du collagène et l'arthrite.

- 5 Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation des molécules de ciblage telles que définies ci-avant pour la délivrance locale de principes actifs dans le voisinage de tissus pathologiques chez des sujets.

La présente invention concerne en outre des méthodes de traitement d'une pathologie chez  
10 un sujet comprenant l'administration d'une molécule ou d'une composition telles que définies ci-avant. De préférence, la pathologie concernée est un cancer ou une inflammation. La méthode de traitement peut comprendre en outre une étape préalable consistant en un traitement permettant de générer des cellules engagées dans un processus d'apoptose dans le tissu pathologique. Elle concerne également des méthodes de délivrance  
15 locale de principes actifs dans le voisinage de tissus pathologiques chez des sujets, comprenant l'administration d'une molécule ou d'une composition telles que définies ci-avant.

Ces différents aspects de l'invention seront décrits plus en détails dans la suite du texte.

20

#### MOLECULE DE CIBLAGE ET DE LIBERATION DE COMPOSE THERAPEUTIQUE

Comme indiqué précédemment, les molécule de l'invention comprennent typiquement trois parties ou domaines fonctionnels liés les uns aux autres, à savoir une région de  
25 ciblage (C), une région biologiquement active (A) et une région de liaison (L) sensible à l'environnement d'un tissu ou d'une cellule pathologique. L'agencement des différents éléments peut varier, et notamment selon l'ordre A-L-C ou C-L-A. D'autre part, dans certains modes de réalisation, la région (ou la fonction) L peut être insérée ou comprise au sein de l'une des régions A ou C.

30

De manière plus préférée :

- 1) Le segment de ciblage C est une molécule capable de reconnaître ou de lier préférentiellement des cellules engagées dans un processus pathologique, de préférence d'apoptose ;

2) Le segment de liaison L est une molécule assurant la liaison entre A et C, ladite liaison étant clivable sur le site cible permettant la libération du segment thérapeutique A ;

3) La partie A est une molécule biologiquement active présentant des propriétés thérapeutiques.

5

#### Segment de Ciblage C

Le segment de ciblage C comprend un polypeptide capable de se lier à la surface de cellules présentes de façon caractéristique ou spécifique dans un tissu présentant une pathologie, ou générées dans ce tissu par un traitement préalable ou combiné. Ce segment  
10 de ciblage C est de préférence capable de se lier aux membranes des cellules engagées dans un processus d'apoptose, celles-ci exposant à leur surface des lipides chargés négativement comme la phosphatidylsérine.

Dans un premier mode de réalisation préféré, la partie C comprend un polypeptide capable  
15 de se lier préférentiellement à la surface des cellules tumorales ou présentes dans un tissu tumoral ou générées dans ces tissus par un traitement au moyen d'un agent favorisant l'apoptose, par exemple un anti-tumoral (chimiothérapie, radiothérapie, etc.).

Dans un autre mode de réalisation préféré, le segment de ciblage C comprend un  
20 polypeptide capable de se lier préférentiellement à la surface des cellules présentes dans un tissu inflammatoire et en particulier les cellules neutrophiles qui s'accumulent dans ces tissus et y meurent par apoptose 24 à 48 heures après leur arrivée. Les neutrophiles constituent des « appâts » pour les molécules de ciblage.

25 Le terme « se lier préférentiellement » indique que l'élément de ciblage possède une affinité particulière pour les cellules ou tissus considérés, même si une liaison non spécifique ou moins importante avec d'autres cellules ou tissus ne peut être totalement exclue *in vivo*. La liaison préférentielle assure néanmoins un ciblage des molécules chimères de l'invention vers les sites pathologiques, réduisant la dissémination et les effets  
30 secondaires potentiels.

Le segment de ciblage C est de préférence une molécule peptidique. On entend par molécule peptidique toute molécule composée ou comprenant des acides aminés, naturels ou non, éventuellement modifiés, comme par exemple toute protéine ou fragment de

protéine, un polypeptide ou peptide, naturels ou synthétiques, modifiés ou non. La propriété commune de ces éléments est de pouvoir se lier de manière préférentielle à des cellules caractéristiques de situations pathologiques et, dans un mode plus préféré, aux membranes cellulaires exposant des lipides chargés négativement, notamment la phosphatidylsérine. D'une façon générale, la présente invention prévoit l'utilisation de toute protéine, fragment ou dérivé de protéine répondant à ce critère.

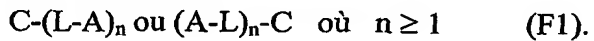
Il existe plusieurs familles de protéines capables de se lier aux membranes exposant des lipides chargés négativement. On peut citer notamment la famille des Annexines, les familles de protéines comportant un domaine C1 ou C2, telles que les facteurs V et VIII de la coagulation sanguine ; les familles de protéines comportant un domaine PH ou un domaine FYVE ; ou encore les protéines comportant un domaine identique ou homologue du domaine 5 des  $\beta$ 2-Glycoprotéines-I ( $\beta$ GP-I). Ces protéines, ou des domaines issus ou dérivés de leurs séquences peuvent être utilisés comme élément de ciblage dans les molécules chimères de l'invention. Pour des raisons d'immunogénicité, on choisit de préférence la version humaine de ces protéines ou domaines de protéines. De plus, il convient chaque fois que cela est possible, de sélectionner et d'utiliser le plus petit domaine actif de ces protéines afin d'assurer la meilleure diffusion de la molécule au travers de la micro-vascularisation vers les tissus ciblés et surtout une meilleure bio-distribution et élimination par la voie rénale.

Dans un mode de mise en œuvre particulier de la présente invention, l'élément de ciblage comprend une séquence peptidique dérivée des protéines ou fragments de protéines mentionnés plus haut. Par fragment est entendu une séquence d'au moins 10 acides aminés consécutifs, de préférence entre 50 et 500 acides aminés, de manière encore plus préférée environ 250 à 350 acides aminés. Ces dérivés présentent au moins 50 % d'identité avec les protéines initiales ou les fragments de celles-ci. De préférence, ils présentent 60 %, 75 %, 90 % ou 95 % d'identité. Certains des domaines de protéines mentionnés, notamment les domaines PH et FYVE, peuvent par ailleurs être mutés de façon à modifier leur spécificité lipidique pour les adapter aux besoins précis du ciblage de cellules en phase apoptotique.

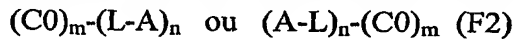
Le segment de ciblage C peut contenir un ou plusieurs sites de liaison au segment L. La présence de plusieurs sites présente l'avantage de pouvoir distribuer plusieurs molécules

thérapeutiques A en une seule fois et d'augmenter dans les mêmes proportions la concentration de A dans l'environnement des tissus touchés par la pathologie concernée.

Dans un mode de réalisation particulier, la structure de la molécule selon la présente invention est alors :



Dans un autre mode de réalisation, éventuellement combinable avec le précédent, le segment de ciblage C peut comprendre une répétition de plusieurs polypeptides ou motifs de liaison aux cellules pathologiques ou cibles (désignés C0), afin d'augmenter l'efficacité du ciblage. La formule générale de telles molécules est la suivante :



où n et m sont, indépendamment l'un de l'autre, un nombre entier supérieur ou égal à 1.

Pour optimiser le comportement *in vivo* de la molécule thérapeutique, on choisit de préférence m et/ou n = 1 ou 2.

Selon une première variante spécifique de l'invention, le segment de ciblage C comprend la séquence d'une annexine, ou d'un fragment ou un dérivé de celle-ci. Le segment de ciblage C comprend de préférence la séquence du « coeur à quatre domaines » d'une protéine de la famille des annexines. De préférence, l'annexine est de type V, un fragment ou un dérivé de celle-ci. L'annexine d'origine humaine est privilégiée. De préférence, le segment de ciblage C comprend le domaine 1 de cette annexine.

Selon une première variante spécifique de l'invention, le segment de ciblage C comprend un domaine de type C1 ou C2, un fragment ou un dérivé de celui-ci. Plus particulièrement, l'invention concerne des segments de ciblage C comprenant la séquence d'un domaine C1 d'un facteur de coagulation, un fragment ou un dérivé de celui-ci. De façon alternative, l'invention concerne des segments de ciblage C comprenant la séquence d'un domaine C2 du facteur VIII humain de la coagulation, un fragment ou un dérivé de celui-ci.

Dans un mode préféré de réalisation, le segment de ciblage C est un polypeptide construit sur la base d'une topologie de domaine de type C1. De préférence, le segment de ciblage C

comprend un polypeptide de séquence choisie parmi SEQ ID Nos 1-8, de préférence SEQ ID Nos 2-4, et 6-8, ou un fragment de celui-ci.

*Domaine de type C1 du facteur V humain de la coagulation - C1F5-S0 (F-V) séquence*

5 *sauvage*

**(SEQ ID No 1)**

DCRMPLMGLST GIISDSQIKA SEFLGYWEPR LARLNNGGSY NAWSVKLA  
EFASKPWLQI DMQKEVIITG IQTQGAHYL KSCYTTEFYV AYSSNQINWQ  
IFKGNSTRNV MYFNGNSDAS TIKENQFDPP IVARYIRISP TRAYNRPTLR

10 LELQGC

*Polypeptides construits sur la base du domaine de type C1 du facteur V humain de la coagulation*

**C1F5-S1 (SEQ ID No 2)**

15 DCRMPLMGLST GIISDSQIKA SEFLGYWEPR LARLNNGGSY NAWSVKLA  
EFASKPWLQI DMQKEVIITG IQTQGAHYL KSCYTTEFYI AYSSNQINWQ  
IFKGNSTRNV MYFNGNSDAS TIKENQLDPP IVARYIRISP TRAYNRPTLR  
LELQGC

20 **C1F5-S2 (SEQ ID No 3)**

DCRMPLMGLST GIISDSQIKA SEFLGYWWR LARLNNGGSY NAWSVKLA  
EFASKPWLQI DLQKEVIITG IQTQGAHYL KSCYVTEFYV AYSSNQINWQ  
IFKYNSTRNV MYFNGNSDAS TIKENQFDPP LVARYIRISP TRAYNRITLR  
LELQGC

25

**C1F5-S3 (SEQ ID No 4)**

DCRMPLMGLST GIISDSQIKA SEFLGYWEPR LARLNNGGSY NAWSVKLA  
EFASKPWLQI DLQKEVIITG IQTQGAHYL KSCYTTEFYI AYSSNQINWQ  
IFKGNSTRNV MYFNGNSDAS TIKENQLDPP IVARYIRISP TRAYNRPTLR

30 LELQGC

*Domaine de type C1 du facteur VIII humain de la coagulation - C1F8-S0 (F-V) séquence sauvage*

**(SEQ ID No 5)**

35 KCQTPLGMAS GHIRDFQITA SGQYGQWAPK LARLHYSI NAWSTKEPFS  
WIKVDLLAPM IHHGIKTQGA RQKFSSLYIS QFIIMYSLDG KKWQTYRGNS  
TGTLMVFFGN VDSSGIKHNI FNPPIIARYI RLHPHTHSIR STLRMELMGC

*Polypeptides construits sur la base du domaine de type C1 du facteur VIII humain de la coagulation*

**C1F8-S1 (SEQ ID No 6)**

5 KCQTPMGLAS GHIRDFQITA SGQYGQWAPK LARLHYSGLI NAWSTKEPFS  
 WLKIDLLAPM IIHGIKTQGA RQKFSSLYIS QYIIMYSLDG KKWQTYRGNS  
 TGTLMVFFGN VDSSGIKHNI FNPPIIARYI RLHPHTHSIR STLRMELMGC

**C1F8-S2 (SEQ ID No 7)**

10 KCQTPMGLAS GHIRDFQITA SGQYGQWAPK LARLHYSGLI NAWSTKEPFS  
 WIKVDLLAPM IIHGVKTQGA RQKFSSLYIS QFIIMYSLDG KKWQTYRYNS  
 TGTLMVFFGN VDSSGIKHNI FNPPLIARYI RLHPHTHSIR STLRMELMGC

**C1F8-S3 (SEQ ID No 8)**

15 KCQTPLGMAS GHIRDFQITA SGQYGQWWPK LARLHYSGLI NAWSTKEPFS  
 WLKIDLLAPM IIHGIKTQGA RQKFSSLYIS QFIIMYSLDG KKWQTYRGNS  
 TGTLMVFFGN VDSSGIKHNI FNPPLLARYI RLHPHTHSIR STLRMEVMGC

Dans un autre mode préféré de réalisation, le segment de ciblage C est un polypeptide  
 20 construit sur la base d'une topologie de domaine de type C2. De préférence, le segment de ciblage C comprend un polypeptide de séquence choisie parmi SEQ ID Nos 9-16, de préférence SEQ ID Nos 10-12, et 14-16, ou un fragment de celui-ci.

*Domaine de type C2 du facteur V humain de la coagulation – C2F5-S0 (F-V) séquence*  
 25 *sauvage*

**(SEQ ID No 9)**

CSTPLGMENG KIENKQITAS SFKKSWWDY WEPFRARLNA QGRVNAWQAK  
 ANNNKQWLEI DLLKIKKITA IITQGCKSL S EMYVKSFTI HYSEQGVEWK  
 PYRLKSSMVD KIFEGTNTK GHVKNFFNPP IISRFIRVIP KTWNQSITLR  
 30 LELEFGCDIY

*Polypeptides construits sur la base du domaine de type C2 du facteur V humain de la coagulation*

**C2F5-S1 (SEQ ID No 10)**

35 CSTPLGMENG KIENKQITAS SFKKSWWDY WEPFRARLNA QGRVNAWQPK  
 ANNNKQWLEV DLLKIKKITA VITQGCKSL S EMYVKSFTI HYSEQGVEWK

PFRLKSSMVD KINEGNTNTK GHVKNFPNPP RISRFIRVIP KTWNQSITLR  
LELFGCDIY

**C2F5-S2 (SEQ ID No 11)**

5 CSTPLGIENG KIENKQITAS SFKKSWWGDY WEPFRARLNA QGRVNAWQAK  
ANNKQWLEM DFLKIKKITA VITQGCKSLS SEMYVKSFTI HYSEQGVEWK  
PYRLKSSMVD KIFEGNTNTK GHVKNFFNPP IISRFIRQIP KTWNQSITLR  
LELYGCDIY

**10 C2F5-S3 (SEQ ID No 12)**

CSTPLGIENG KIENKQITAS SFKKSWWGDY WEPFRLRLNA QGRVNAWQAK  
ANNKQWAEM DLLKIKKITA IITQGCKSLS SEMYVKSFTI HYSEQGVEWK  
PYRLKSSMVD KIFEGNTNTK GHVKNFFNPP IITRFIRVIP KTWNQSITIR  
LELFGCDIY

15

*Domaine de type C2 du facteur VIII humain de la coagulation – C2F8-S0 (F-V) séquence sauvage*

**(SEQ ID No 13)**

CSMPLGMESK AISDAQITAS SYFTNMFATW SPSKARLHLQ GRSNAWRPQV  
20 NNPKEWLQVD FQKTMKVTGV TTQGVKSLLT SMYVKEFLIS SSQDGHQWTL  
FFQNGKVKVF QGNQDSFTPV VNSLDPPLLT RYLRIHPQSW VHQIALRMEV  
LGC

*Polypeptides construits sur la base du domaine de type C2 du facteur VIII humain de la coagulation*

25

**C2F8-S1 (SEQ ID No 14)**

CSMPLGMESK AISDAQITAS SYFTNMFATW SPSKARLHLQ GRSNAWRAQV  
NNPKEWLQID LQKTMKITGI TTQGVKSLLT SMYVKEYLIS SSQDGHQWTL  
FYQNGKVKVF QGNQDSFTPV VNSLDPFLLT RYLRIHPVSW VHQIALRMEV  
30 LGC

**C2F8-S2 (SEQ ID No 15)**

CSMPLGMESK AISDAQITAS SYKTNMFATW SPSKARLHLQ GRSNAWRAQV  
NNPKQWLQVD FQKTMKVTGV TTQGVKSLLT SMYVKEFLIS SSQDGHQWTL  
35 FFQNGKVKVF QGFQDSFTPV VNSLDPPLLT IYLRIHPQSW VHQIALRMEV  
LEC

**C2F8-S3 (SEQ ID No 16)**

CSMPLGMESK AISDAQITAS SYKTNMFATW SPSKARLHLQ GRSNAWRPQV  
 NNPKEWLQVD FQKTMKVTGV TTQGVKSLLT SMYVKEYLIS SSQDGHQWTL  
 FYQNGKVKVF QGNQDSFTPV VNSLDPFLLT RYLRIHPQSW VHQIALRMEV

5 LEC

Dans un mode préféré de réalisation, le segment de ciblage C est un polypeptide construit sur la base d'une topologie de type domaine 5 des  $\beta$ 2-Glycoprotéines-I ( $\beta$ 2GP-I) (SEQ ID No 17). De préférence, le segment de ciblage C comprend un polypeptide de séquence  
 10 choisie parmi SEQ ID Nos 17-22, de préférence SEQ ID Nos 18-22, ou un fragment de celui-ci.

*Domaine 5 des  $\beta$ 2-Glycoprotéines-I humaines –  $\beta$ 2GP-I séquence sauvage*  
**(SEQ ID No 17)**

15 TKASCKVPVK KATVVYQGER VKIQEKFKNG MLHGDKVSFF CKNKEKKCSY  
 TEDAQCIDGT IEVPKCFKEH SSLAFWKTD A SDVKPC

Dans un mode de réalisation préféré, le segment de ciblage C comprend un polypeptide dont la séquence générale est la suivante :

20 T J<sub>2</sub> A S C K U<sub>7</sub> P U<sub>9</sub> K J<sub>11</sub> U<sub>12</sub> T U<sub>14</sub> U<sub>15</sub> U<sub>16</sub> J<sub>17</sub> G E R U<sub>21</sub> J<sub>22</sub> U<sub>23</sub> Q E K U<sub>27</sub> J<sub>28</sub> N G M L  
 H G D K U<sub>37</sub> S F U<sub>40</sub> C J<sub>42</sub> N J<sub>44</sub> E J<sub>46</sub> J<sub>47</sub> C J<sub>49</sub> Y T E D U<sub>54</sub> Q C I D G T U<sub>61</sub> E V P K C U<sub>67</sub>  
 J<sub>68</sub> E H S J<sub>72</sub> U<sub>73</sub> U<sub>74</sub> J<sub>75</sub> J<sub>76</sub> J<sub>77</sub> T D A S D V J<sub>84</sub> P C (SEQ ID No 18) (S4)

où:

J<sub>2</sub> = K, D, E ; J<sub>11</sub>, J<sub>22</sub>, J<sub>28</sub>, J<sub>42</sub>, J<sub>44</sub>, J<sub>46</sub>, J<sub>47</sub>, J<sub>68</sub>, J<sub>77</sub>, J<sub>17</sub> = Q, E ; J<sub>84</sub> = K, R ; J<sub>49</sub> = S,  
 25 T ; J<sub>72</sub> = S, T, M ; U<sub>7</sub> = L, V, I ; U<sub>9</sub> = V, I, T ; U<sub>12</sub> = A, M ; U<sub>14</sub>, U<sub>15</sub>, U<sub>21</sub>, U<sub>23</sub>, U<sub>37</sub> =  
 V, I, T ; U<sub>16</sub>, U<sub>27</sub>, U<sub>40</sub>, U<sub>67</sub> = F, Y ; U<sub>54</sub> = A, V, I ; U<sub>61</sub> = I, V, M ; U<sub>73</sub>, U<sub>74</sub>, U<sub>75</sub>, U<sub>76</sub>  
 = L, I, F, Y, M, W.

De préférence, le segment de ciblage C comprend un polypeptide de séquence choisie  
 30 parmi SEQ ID Nos 19-22 ou un fragment de celui-ci :

*Polypeptides construits sur la base du domaine 5 des  $\beta$ 2-Glycoprotéines-I humaines*

**GPI-S1 (SEQ ID No 19)**

TEASCKVPVK RATVVYEGE R VRIQEKFKNG MLHGDKVSFF CRNRERRCSY  
 35 TEDAQCIDGT IEVPKCYREH SMLTWWRTDA SDVKPC

**GPI-S2 (SEQ ID No 20)**

TEASCKLPTK RMTVVYEGER VRIQEKFKNG MLHGDKISFF CRNRERRCSY  
 TEDAQCIDGT IEVPKCYREH SMITWWRTDA SDVKPC

5

**GPI-S3 (SEQ ID No 21)**

TKASCKVPTK KMTVVYQGER VKIQEKFKNG MLHGDKISFF CKNKEKKCSY  
 TEDAQCIDGT IEVPKCYKEH SSLAWWKTD A SDVKPC

**10 GPI-S4 (SEQ ID No 22)**

TKASCKVPTK KMTVVYQGER VKIQEKFKNG MLHGDKISFF CKNKEKKCSY  
 TEDAQCIDGT IEVPKCYKEH SSLAFWKTD A SDVKPC

Dans un mode de réalisation préféré, le segment de ciblage C comprend un polypeptide  
 15 dont la séquence générale est la suivante :

J<sup>1</sup>-J<sup>2</sup>-J<sup>3</sup>-J<sup>4</sup>-J<sup>5</sup>-J<sup>6</sup>-Z<sup>7</sup>-U<sup>8</sup>-J<sup>9</sup>-J<sup>10</sup>-U<sup>11</sup>-R-J<sup>13</sup>-J<sup>14</sup>-U<sup>15</sup>-K-G-X<sup>18</sup>-G-T-J<sup>21</sup>-E-J<sup>23</sup>-J<sup>24</sup>-U<sup>25</sup>-J<sup>26</sup>-J<sup>27</sup>-J<sup>28</sup>-  
 U<sup>29</sup>-J<sup>30</sup>-J<sup>31</sup>-R-J<sup>33</sup>-J<sup>34</sup>-J<sup>35</sup>-J<sup>36</sup>-B<sup>37</sup>-J<sup>38</sup>-J<sup>39</sup>-U<sup>40</sup>-J<sup>41</sup>-J<sup>42</sup>-J<sup>43</sup>-U<sup>44</sup>-J<sup>45</sup>-J<sup>46</sup>-J<sup>47</sup>-J<sup>48</sup>-J<sup>49</sup>-R-J<sup>51</sup>-U<sup>52</sup>-J<sup>53</sup>-  
 J<sup>54</sup>-D-U<sup>56</sup>-K-S-Z<sup>59</sup>-L-J<sup>61</sup>-J<sup>62</sup>-J<sup>63</sup>-J<sup>64</sup>-Z<sup>65</sup>-J<sup>66</sup>-J<sup>67</sup>-U<sup>68</sup>-J<sup>69</sup>-J<sup>70</sup>-J<sup>71</sup>-U<sup>72</sup>-J<sup>73</sup>-J<sup>74</sup>-J<sup>75</sup>-J<sup>76</sup>

(S5)

20 dans laquelle J, Z, U, X, et B représentent des acides aminés tels que :

- les acides aminés J sont choisis indépendamment les uns des autres parmi les acides aminés naturels, ou des dérivés de ceux-ci, de telle manière qu'au moins 50 % d'entre eux sont des résidus polaires choisis parmi R, N, D, C, Q, E, G, H, K, Orn, P, S, T et Y,

- les acides aminés U sont choisis parmi A, C, G, I, L, M, F, W, Y, et V,

25 - l'acide aminé X<sup>18</sup> est choisi indépendamment des autres acides aminés de la séquence parmi A, N, C, Q, G, H, I, L, M, F, S, T, W, Y et V,

- l'acide aminé B<sup>37</sup> est choisi indépendamment des autres acides aminés de la séquence parmi R, A, C, G, I, L, M, F, W, Y, et V,

- l'acide aminé Z<sup>7</sup> est choisi indépendamment des autres acides aminés de la séquence  
 30 parmi D et E,

- les acides aminés Z<sup>59</sup> et Z<sup>65</sup> sont choisis indépendamment parmi E, D, K, et R,  
 les exposants indiquant la position des acides aminés dans la séquence.

De préférence, les acides aminés J peuvent être choisis indépendamment les uns des autres  
 35 parmi l'ensemble des résidus A, R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, Orn, F, P, S, T, W, Y,

et V, et de telle manière qu'au moins 50 % d'entre eux sont des résidus polaires choisis parmi R, N, D, C, Q, E, G, H, K, Orn, P, S, T.

Différentes combinaisons de résidus U et B sont données dans le tableau 1 ci-dessous :

5

Tableau 1

	U <sup>8</sup>	U <sup>11</sup>	U <sup>15</sup>	U <sup>25</sup>	U <sup>29</sup>	B <sup>37</sup>	U <sup>40</sup>	U <sup>44</sup>	U <sup>52</sup>	U <sup>56</sup>	U <sup>68</sup>	U <sup>72</sup>
Ex 1	V	L	M	I	L	R	I	Y	L	L	V	L
Ex 2	A	I	I	I	L	R	I	Y	L	L	I	L
Ex 3	A	I	I	I	L	R	I	Y	L	L	M	V
Ex 4	A	L	M	L	L	R	I	Y	L	L	I	M
Ex 5	A	L	M	I	I	R	V	Y	L	L	I	M
Ex 6	A	L	M	I	I	R	I	F	L	L	I	M
Ex 7	A	L	M	I	V	R	I	F	L	L	I	F
Ex 8	V	L	M	I	L	R	I	F	L	L	I	M
Ex 9	A	L	M	I	L	R	I	F	L	L	I	M
Ex10	A	L	M	I	L	R	I	Y	L	L	A	A
Ex11	V	L	M	I	L	R	I	Y	L	L	V	L
Ex12	V	L	M	I	L	R	I	F	L	L	V	L

A titre d'exemple, le peptide de formule S1 peut être avantageusement une séquence peptidique choisie parmi les séquences peptidiques SEQ ID No 23-32.

- 10 La séquence S1 représente un type de peptides dans sa forme la plus courte. Il est bien entendu que cette séquence peut comprendre en outre un ou plusieurs acides aminés supplémentaire à l'une ou l'autre des extrémités, par exemple de 1 à 15 acides aminés, en général de 1 à 10 acides aminés pour obtenir une fonctionnalisation supplémentaire. Par exemple, une petite séquence, dite de fonctionnalisation, peut être liée au peptide
- 15 permettant la fixation au segment L. Cette séquence de fonctionnalisation peut être située à l'extrémité N-terminale de la séquence S1. Elle peut être d'environ 3 acides aminés choisis de préférence parmi G-S-C-, G-S-T-, G-S-P-, G-S-S-, G-S-G-, et G-S-Q-. Elle peut être également d'environ 4 acides aminés, choisis de préférence parmi les séquences G-S-Aa-C-, G-C-Aa-S-, G-S-Aa-S-, G-C-Aa-C-, et G-C-Aa-S- où Aa est un acide aminé
- 20 quelconque.

Ces séquences de fonctionnalisation sont avantageuses en ce qu'elles permettent en particulier le marquage aisé par des radio-traceurs comme le  $^{99m}\text{Tc}$  ou le  $^{18}\text{F}$  et permettent, par injection chez l'homme à dose traceuse, de suivre parfaitement *in vivo* le devenir du médicament, sa bio-distribution et de contrôler sa bonne localisation.

5

Par ailleurs la séquence S1 peut être dupliquée au sein d'un même peptide pour produire une molécule présentant une affinité encore plus élevée pour les sites apoptotiques.

### Segment de Liaison L

10

Le segment L est une molécule de liaison clivable sur le site cible, et reliant la partie A et la partie C. Le segment L peut être toute molécule ou liaison chimique, de type covalent, y compris des molécules en partie ou totalement de nature peptidique, modifiée ou non, naturelle ou non. Le segment L contient avantageusement une fonction chimique reconnue et clivable dans l'environnement du tissu ou des cellules pathologiques, par exemple par une enzyme ou un ensemble d'enzymes spécifiques de l'environnement des cellules ciblées.

La présence, entre les parties A et C, du segment de liaison L clivable préférentiellement dans l'environnement des cellules ciblées permet une libération locale et ciblée du principe actif et confère aux molécule de l'invention un comportement de type pro-drogue ciblée. En effet, la molécule est peu active tant qu'elle ne réside pas dans l'environnement des cellules ciblées possédant les enzymes ou autres facteurs de clivage.

Le segment de liaison L peut être simple ou ramifié. L'intérêt d'une ramification est de pouvoir amener et distribuer plusieurs molécules thérapeutiques avec une seule molécule de ciblage C. Dans ce mode de mise en œuvre, la structure générale du segment de liaison est donc  $L = D(L_0)_n$ , où D est un élément de ramification, n est un nombre entier égal ou supérieur à 1 (correspondant au nombre de bras que comporte la ramification), et  $L_0$  est le lien proprement dit.

Il en découle que le composé faisant l'objet de la présente invention possède l'une des deux formules générales suivantes selon l'ordre dans lequel se succèdent les différentes parties :



Le segment L (ou L0) peut être de nature variée, comme une liaison ou molécule chimique,  
5 et en particulier de nature peptidique.

Dans un mode de mise en œuvre préféré, le segment L est un lien peptidique clivable  
sensible aux protéases (ou autres enzymes), dénommées dans la suite du texte « protéases  
intervenantes », plus spécifiquement sur-exprimées soit à la surface des cellules présentant  
10 la pathologie, soit libérées dans l'environnement des cellules ciblées, soit encore libérées  
par les cellules en phase apoptotique.

Les cellules tumorales et inflammatoires, ainsi que, par exemple, les cellules stromales  
recrutées dans l'environnement de celles-ci, sont connues pour excréter une variété de  
15 protéases intervenantes, en particulier des métallo-protéases de la matrice extra-cellulaire  
(MMP), des urokinases, les protéases spécifiques du clivage du segment extracellulaire des  
cytokines membranaires ou de leurs récepteurs (ADAM), etc. Des exemple de séquences  
clivées par ces protéases sont données dans le Tableau 2. Ces protéases intervenantes  
jouent un rôle important dans l'évolution de la tumeur ou du tissu inflammatoire et  
20 notamment dans l'envahissement des tissus environnants et la formation de métastases, ou  
l'envahissement par les cellules spécialisées de réaction inflammatoire. Par exemple, le  
taux de MMP dans l'environnement tumoral ou inflammatoire est bien supérieur à celui  
présent dans un tissu normal car, en particulier, le contrôle de l'expression de ces MMP  
dépend de l'action de certaines cytokines. Il donc possible de mettre à profit ce différentiel  
25 d'expression pour amplifier le principe du ciblage du composé anti-tumoral ou anti-  
inflammatoire en ne permettant l'activation de ce composé qu'aux sites de ciblage. Des  
pro-drogues simples ont déjà été conçues mais elle ne résolvent pas le problème de la  
distribution uniforme du médicament dans l'ensemble de l'organisme car il n'y a pas  
d'accumulation de la pro-drogue au sein du tissu cancéreux ou inflammatoire. Au  
30 contraire, dans la présente invention, on propose un moyen d'accumuler le principe anti-  
tumoral ou anti-inflammatoire uniquement dans le tissu tumoral ou inflammatoire  
comportant déjà des cellules en voie d'apoptose, et de rendre actif le médicament  
essentiellement dans ce tissu. Autrement dit, l'ensemble C-L ou L-C constitue un système  
de vectorisation-activation de composés anti-tumoraux ou anti-inflammatoires. Cet

ensemble répond donc au double impératif suivant : réduire la concentration effective moyenne du médicament dans l'organisme, c'est à dire réduire les effets toxiques secondaires, et restreindre l'action du médicament au seul tissu intéressant, c'est à dire augmenter son efficacité.

5

Le segment de liaison clivable L (ou L0) est donc un lien au moins partiellement peptidique comportant une séquence reconnue et clivée par une protéase intervenante majoritairement présente dans le tissu ciblé. Le lien L ou L0 peut donc être représenté comme comprenant deux parties, L1-L2, conçues de telle sorte que les protéases  
10 intervenantes clivent la liaison peptidique du lien entre L1 et L2 et que la molécule libérée L2-A ou A-L1, selon les molécules choisies, soit une molécule active au plan thérapeutique, de préférence au moins autant que la molécule initiale A. La longueur des parties L1 et L2 peut être optimisée en fonction de l'accessibilité nécessaire au site actif  
15 de la molécule finale pour les raisons évoquées plus haut. Pour tenir compte de toutes les possibilités associées à la structure finale du composé thérapeutique, A-L-C ou C-L-A, la structure la plus générale proposée pour le lien L est la suivante :



20 où D, L1, L2 et n ont la définition donnée plus haut.

La liaison entre les différents éléments fonctionnels des molécules de l'invention peut être réalisée par toute méthode de couplage chimique, enzymatique ou génétique connue en soi de l'homme du métier. Ainsi, il peut s'agir de liaisons chimiques, peptidiques, nucléiques,  
25 etc. Les groupements peuvent être couplés entre-eux par des liaisons maléimides, succinimide, intéine, biotine, amine, amide, carboxyliques, phosphate, ester, éther, etc.

Dans une variante de l'invention, le lien L est lié à la molécule C (et/ou A) par un groupe maléimide, connu pour sa réaction rapide et totale avec un groupe thiol porté par un résidu  
30 cystéine accessible du segment de ciblage C (et/ou de la molécule A).

Dans une autre variante, le lien L est lié à la molécule C (et/ou A) par réaction du groupe carboxylique terminal du peptide L avec un groupe amino porté par le segment thérapeutique A (ou de ciblage C).

Dans une autre variante de réalisation, le segment de liaison L est couplé à l'extrémité C-terminale (dans le cas d'une molécule  $H_2N-L-A$ ) ou N-terminale (dans le cas d'une molécule  $A-L-COOH$ ) du segment C au moyen d'une intéine. L'intérêt de ce mode de construction de la molécule finale, par rapport au mode précédant utilisant une liaison par groupe maléimide, est qu'il préserve la possibilité de disposer d'une cystéine libre dans la molécule, pour une autre fonctionalisation ou pour un radio-marquage éventuel pour le suivi du médicament. Il y a en effet un grand intérêt thérapeutique à pouvoir suivre et contrôler au moyen de l'imagerie la bio-distribution et la cinétique de cette bio-distribution pour ce type de médicament ciblé.

Dans certains modes de réalisation, le segment L (ou la fonction de clivage) fait partie de l'élément C ou A. Il peut s'agir par exemple d'une extension N-terminale ou C-terminale du segment C ou A, notamment lorsque ce dernier est de nature peptidique.

Les molécules de l'invention peuvent être assemblées en une ou plusieurs étapes, selon les techniques de couplage mises en œuvre. Ainsi, une molécule de type C-L peut être réalisée dans un premier temps, puis couplée avec une ou plusieurs molécules thérapeutiques A. Alternativement, lorsque les liaisons entre les segments fonctionnels font appel à des réactions chimiques différentes, une synthèse ou un assemblage simultanée sont possibles.

Etant donnée la taille du segment de liaison (généralement de environ cinq à environ vingt résidus, pour un segment de nature peptidique), la version purement peptidique du lien L est de préférence obtenue par synthèse directe, en utilisant notamment les synthétiseurs de peptides courants et les méthodes classiques de synthèse, notamment en phase solide. L'avantage de la synthèse directe du lien est qu'elle autorise l'utilisation de résidus aminoacides non naturels permettant ainsi une meilleure adaptation de la séquence aux protéases intervenantes. Cette séquence de reconnaissance peut en outre être modifiée par rapport à la séquence naturelle de reconnaissance par une enzyme ou un facteur de clivage, par exemple pour lui conférer une meilleure affinité ou spécificité envers la protéase en question.

La longueur du segment de liaison peut être adaptée par l'homme du métier en fonction des besoins et de la nature des segments C et A. De manière générale, on utilise un

segment de liaison assez court et essentiellement non immunogène. Il s'agit typiquement d'un segment de nature peptidique comprenant de 3 à 20 résidus d'acides aminés, de préférence de 3 à 15, encore plus préférentiellement de 4 à 12. Dans certains cas, comme indiqué ci-après, il peut être intéressant de modifier la longueur du segment L, notamment 5 pour éloigner la partie peptidique du segment C ou A, ou pour créer des molécules à fonction particulière (pénétration dans la cellule, action sur cellules voisines, etc.).

Ainsi, il peut y avoir avantage à ce que le lien L ou L0 contienne une partie d'espacement pour éloigner le site de clivage (et la partie peptidique) du segment de ciblage C. Dans ce 10 cas L ou L0 peut prendre l'une des deux structures suivantes :

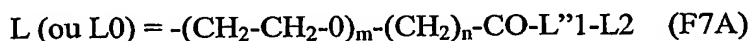


où, dans l'un et l'autre cas :

- L'1 est un groupe d'espacement non-peptidique et L''1 la partie peptidique proprement dite ; 15
- L'2 est un groupe d'espacement non-peptidique et L''2 la partie peptidique proprement dite.

Le groupe d'espacement non peptidique peut être choisi parmi toute molécule chimique 20 synthétique, de préférence stable chimiquement et peu immunogène. Il peut s'agir notamment d'un polymère, par exemple de type polyoxyéthylène, dextran, polyéthylèneimine, etc. Un exemple préféré est le polyoxyéthylène, fonctionnalisé ou non. Dans les formules ci-dessus, L''1-L2 et L1-L''2 peuvent représenter le même peptide. Par ailleurs, le nombre de résidus des segments peptidiques L''1-L2 ou L1-L''2 peut varier de 25 quatre à plus de vingt, la valeur optimale étant de l'ordre de six.

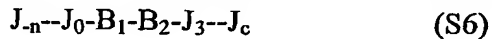
Dans un exemple particulier de mise en œuvre, le segment de liaison clivable répond à la formule suivante :



où m est un nombre entier supérieur ou égal à 0 et L''1 et L''2 un peptide dont la séquence comprend au moins un site de clivage par une des protéases généralement présentes dans l'environnement ciblé. On notera que L''1-L2 et L1-L''2 peuvent

représenter le même peptide. Le nombre de résidus des segments peptidiques L''1-L2 ou L1-L''2 peut varier de quatre à plus de vingt, la valeur optimale étant de l'ordre de six.

On présente dans les exemples suivants un ensemble de séquences peptidiques pour L''1-L2 ou L1-L''2 répondant aux divers critères donnés dans l'ensemble du texte qui précède :



où :

- \*  $J_n--J_0-B_1$  représente indifféremment les segments L''1 et L1 ;
- \*  $B_2-J_3--J_c$  représente indifféremment les segments L2 et L''2 ;
- 10 \* la liaison peptidique  $B_1-B_2$  est la liaison clivée par les protéases intervenantes.
- \* n et c peuvent varier de 0 à environ 10 et dépendent de l'extrémité choisie pour la liaison au segment A ; pour l'extrémité liée à A, la valeur de n ou c sera faible et de préférence égale à 0 ( $J_3$  seulement présent) et pour l'extrémité opposée la valeur de n ou c n'est pas limitée et les résidus correspondants seront choisis en fonction de la spécificité des
- 15 protéases intervenantes ciblées.

Le tableau suivant donne un exemple d'ensemble de séquences  $B_1-B_2$  reconnues et clivées par les différentes protéases intervenantes et utilisables préférentiellement pour un segment L clivable :

20

Tableau 2

B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	Exemple de protéase concernée
Val/Ala/Leu/Met	X	Elastase des neutrophiles
Leu/Tyr/Phe	X	Cathepsine G
Ala	Leu	Protéinase 3 (neutrophiles)
Leu	Val	
Val	Cys	
Gly	Leu/Ile	Collagénases : MMP-1, -2, -8, -9, -13
Gly	Val	MMP2, MMP-9
Gly/Ala/Asn/Glu/ Gln/Pro/Arg/His/Asn	Hydrophobes naturels ou non	MMP-3
Polaires : Arg/Asp/Glu/Gln/Thr/Asn Hydrophobe : Ala	Hydrophobes naturels ou non	MMP-7
Ala	Val	ADAM ADAM-17 (TACE)
Asn	Val	
Arg	Phe	

Les séquences  $J_1-J_0$  et  $J_3-J_4$  qui encadrent le site de clivage  $B_1-B_2$  interviennent dans les interactions du lien avec la protéase visée et donc sur la vitesse de la réaction enzymatique

de coupure de la liaison B<sub>1</sub>-B<sub>2</sub>. Les résidus J<sub>-1</sub>, J<sub>0</sub>, J<sub>3</sub> et J<sub>4</sub> de S5 seront avantageusement choisis dans les ensembles suivants :

J<sub>-1</sub> = résidu polaire de préférence

J<sub>0</sub> = Gly, Ala, Leu, Ile, Val, Phe et tout résidu aminoacide non naturel hydrophobe.

5 J<sub>3</sub> = Gly, Ala, Leu, Ile, Val, Phe

J<sub>4</sub> = Gly, Ala, Leu, Ile, Val, Phe ou tout résidu non-naturel hydrophobe ou absent

Les autres résidus, J<sub>-2</sub>--J<sub>-n</sub> et J<sub>5</sub>--J<sub>c</sub> peuvent être n'importe quel résidu aminoacide naturel ou non naturel selon les besoins.

10

D'autre part, la longueur et/ou les propriétés du segment de liaison peuvent être ajustées, par exemple pour construire une molécule permettant au composé thérapeutique A d'interagir avec ou de pénétrer dans une cellule voisine de la cellule cible sur laquelle le segment C la conduit. Dans ce cas, par exemple, le segment de liaison L:

- 15 - doit être suffisamment long pour atteindre les cellules voisines. Pour ce type de lien on choisit de préférence un oligomère chimique, par exemple de type polyoxyéthylène, comprenant un nombre suffisant de monomères pour que la longueur du lien soit d'environ 80 à 200 angström, typiquement de 130 à 150 angström; et/ou
- 20 - comprend un domaine permettant ou facilitant le passage de A dans la membrane cellulaire et, le cas échéant, une région de clivage sensible aux enzymes intra-cellulaires.

25 Dans ce mode de réalisation, le lien possède avantageusement l'une des deux structures suivantes :

L ou L0 = LE-LTM-L3-A (F9A)

L ou L0 = A-L3-LMT-LE (F9B)

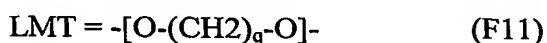
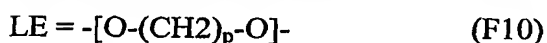
où LE est une partie essentiellement extracellulaire du lien, LTM une partie trans-membranaire et L3 une fonction ou un élément clivable par les protéases ou les estérases

30 intra-cellulaires (e.g., cytosoliques).

La partie LE est préférentiellement suffisamment hydrophile pour permettre une solvation convenable en milieu aqueux afin d'obtenir une structure suffisamment étendue.

La partie LTM, d'une longueur au moins égale à environ 40 Å, être préférentiellement suffisamment amphiphile pour que, d'une part, sa structure dans le milieu aqueux extracellulaire reste faiblement compacte et que, d'autre part, elle puisse traverser le milieu  
5 hydrophobe de la membrane plasmique.

La composition chimique de LE et LMT pourra par exemple être la suivante :



10 où q et p sont des nombres entiers différents de 0,  $q > p$  de telle sorte que, pour LMT, l'environnement lipidique de la membrane soit au plan énergétique plus favorable que l'environnement aqueux. Les valeurs  $p = 2$  et  $5 \geq q \geq 3$  sont préférables.

Comme indiqué précédemment, l'élément de ciblage peut être synthétisé par des  
15 techniques connues en soi de la chimie ou de la biologie. L'élément C-L constitue par ailleurs un objet particulier de l'invention.

### Segment Thérapeutique A

20 L'invention peut être mise en œuvre avec tout type de molécule thérapeutique susceptible d'être associé au segment C. Il peut s'agir de composés chimiques, de médicaments, petites molécules, etc.) de composés peptidiques, nucléiques, lipidiques, etc.

D'une façon générale, le segment thérapeutique A est une molécule présentant une activité  
25 biologique. De préférence, cette activité biologique est réduite (ou inexistante) lorsque le segment thérapeutique est lié aux segments de liaison L et de ciblage C. De ce fait, l'activité biologique s'exprime surtout dans l'environnement des tissus pathologiques, après ciblage et clivage in vivo.

30 Les composés thérapeutiques peuvent avoir des propriétés variées, dans des domaines thérapeutiques variés. Il peut s'agir de médicaments déjà connus, ou de molécules nouvelles ou en développement. Il peut s'agir de composés dont le mode d'action implique une pénétration dans les cellules ou dont l'action implique uniquement une interaction à la

surface de la membrane plasmique. Les composés A préférés de l'invention sont des anti-tumoraux ou anti-inflammatoires.

### Composés anti-tumoraux

- 5 Dans un mode de réalisation particulier, la molécule biologiquement active présente des propriétés anti-tumorales. A peut être n'importe quelle molécule anti-tumorale ou un dérivé actif de ces mêmes molécules. La seule contrainte est que ces composés anti-tumoraux puissent être liés chimiquement au reste de la molécule de vectorisation.
- 10 Comme il a été décrit plus haut, A peut être libérée dans le milieu extra-cellulaire et diffuser de façon passive ou active à l'intérieur des cellules voisines ou bien être amenée dans ces cellules par un lien du type LE-LMT puis libérée par l'action de protéases ou estérases endogènes.
- 15 Un exemple de composé anti-tumoral est constitué par les molécules de la famille des antracyclines et de leurs dérivés.

Ces molécules d'antracycline comportent un sucre aminé. Le groupe amino est avantageusement utilisé pour la liaison au segment L (par exemple à la partie L2 ou LMT)

- 20 du lien défini plus haut .

Un autre exemple de composé anti-tumoral est constitué par les molécules de la famille des  $\text{TNF}\alpha$  ou dérivés de ceux-ci. Ces molécules agissent sur des récepteurs de surface des cellules et induisent l'apoptose.

25

- Parmi les molécules de la famille des  $\text{TNF}\alpha$ , le facteur TRAIL ou Apo2L (P\_W19777) est probablement le plus intéressant dans la mesure où les cellules normales semblent protégées de son action alors que les cellules tumorales y sont sensibles et peuvent être sélectivement éliminées par l'action de cette cytokine pro-apoptotique. Ce facteur peut donc
- 30 être très utile dans les cancers dit « solides » ce qui implique un ciblage efficace pour éviter au maximum les effets secondaires dus à la présence de ces molécules dans le milieu sanguin. Comme toutes les molécules de la famille du TNF, TRAIL est initialement une protéine membranaire associée en trimère et seule la partie extracellulaire est active. Cette partie extracellulaire, TRAIL-Do, ou un ensemble contenant TRAIL-Do, peut donc être

ciblé grâce au segment C et libéré dans l'espace inter-cellulaire grâce à l'action des protéases intervenantes sur le lien clivable L qui relie C et TRAIL-Do. La molécule thérapeutique ainsi constituée possède la structure suivante :

- 5     C-L'1-L''1-L2-( TRAIL-Do)     (selon la formule F6A)  
       (TRAIL-Do)-L1-L''2-L'2-C     (selon la formule F6B)

Un avantage de l'une ou l'autre de ces dispositions est que l'assemblage en trimère des molécules de la famille des TNF, nécessaire à la liaison à leurs récepteurs, est gêné par la  
 10 présence des segments de ciblage et de liaison. Ainsi la molécule reste faiblement active tant que le lien n'est pas clivé par une protéase intervenante. Pour bénéficier de cet avantage particulier il faut que le lien clivable ait une longueur suffisamment faible tout en conservant une accessibilité convenable aux protéases intervenantes.

- 15 Un autre exemple de cytokine, très intéressante pour le traitement de certains cancers et notamment le mélanome et le gliome intracrânien, est l'Interleukine-4 (IL4, 1310839). Malheureusement, étant donnés ses effets secondaires importants, cette protéine ne peut pas être utilisée sans être convenablement ciblée. La liaison à un segment de ciblage C de l'IL4 humaine ou de l'une de ses isoformes ou encore d'un ensemble contenant l'une de  
 20 ces protéines, par l'intermédiaire d'un segment clivable permet de constituer une molécule thérapeutique intéressante en oncologie :

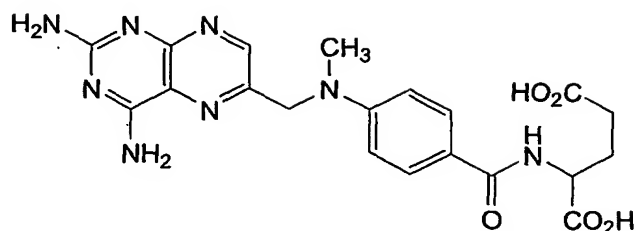
- C-L'1-L''1-L2-(IL4)                    (selon la formule F6A)  
           (IL4)-L1-L''2-L'2-C                    (selon la formule F6B)

25

D'autres exemples de composés anti-tumoraux sont notamment :

a) Le méthotrexate :

30



Le méthotrexate est un composé anti-tumoral couramment utilisé pour le traitement des tumeurs cancéreuses. Il s'agit d'un analogue de l'acide folique qui agit d'abord comme un faux substrat en inhibant la déhydrofolate réductase (DHFR). Il agit aussi par inhibition indirecte de la thymidilate synthétase (TS).

Le méthotrexate contient un aminoacide, l'acide glutamique, qui peut être inséré dans l'extrémité N-terminale d'un peptide de lien clivable selon la formule (F6B) ou (F4B).

10

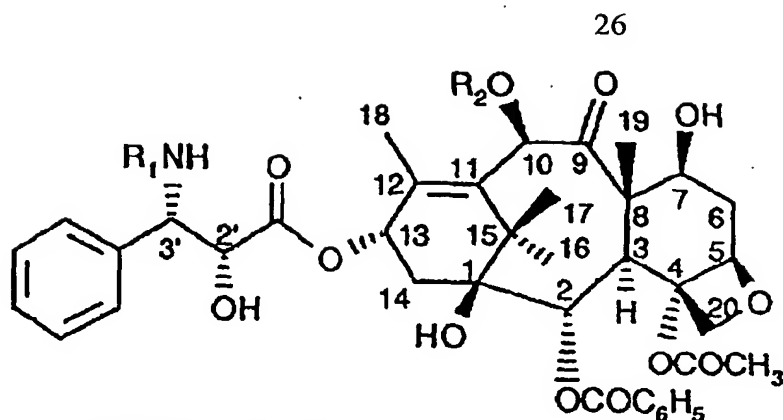
b) Le méthoxyestradiol

Le 2-méthoxyestradiol (1,3,5 (10)-oestratriène-2,3,17 $\beta$ -triol 2-méthyl ether) appelé 2ME<sub>2</sub>, est un sous-produit du métabolisme des œstrogènes ayant la propriété de bloquer la croissance des cellules endothéliales en division rapide et des cellules tumorales.

c) les taxanes :

Les molécules de cette famille ont pour effet le blocage du cycle cellulaire en G2 et M par leur action sur les cytosquelette microtubulaire. Il en résulte une inhibition de la réorganisation normale nécessaire au déroulement de l'interphase de la mitose.

Les taxanes, et particulièrement le docetaxel, comportent des fonctions utilisables pour des modifications permettant son incorporation à l'extrémité d'un peptide clivable par les protéases intervenantes de l'environnement tumoral.



$R_1 = t\text{BuOCO}$ ,  $R_2 = \text{H}$  (docetaxel)

$R_1 = \text{C}_6\text{H}_5\text{CO}$ ,  $R_2 = \text{Ac}$  (paclitaxel)

#### LES TAXANES

d) les antipyrimidines sucre modifiées :

- 5 La cytosine arabinoside (Ara-C) ou cytarabine ou Aracytine est le représentant principal de cette famille. D'autres molécules de cette famille sont la difluoro-déoxy-cytidine (Gemcitabine).

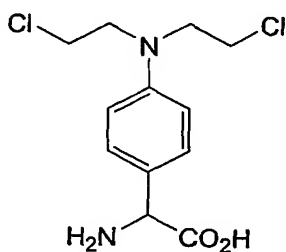
e) Les agents alkylants :

10

Dérivés des « moutardes à l'azote », ces agents ont donné naissance à divers composés anti-tumoraux agissant sur les acides nucléiques et donc dans l'espace intra-cellulaire. Il s'agit en particulier le Melphalan et le Chlorambucil, deux agents alkylants bifonctionnels intéressant pour liaison aisée à un lien peptidique clivable.

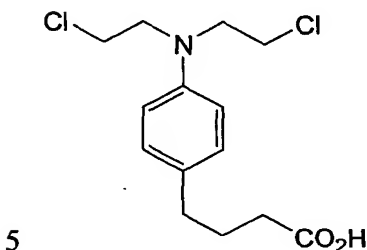
15

Le Melphalan est la Phenylalanine-Moutarde (L-PAM) est aminoacide non naturel qui peut être introduit facilement au début ou à la fin de la synthèse peptidique d'un lien clivable par protéases intervenantes :



20

Le Chlorambucil ne comporte qu'une fonction carboxylique et ne pourra être introduit directement dans un peptide qu'en fin de synthèse du lien peptidique clivable par les protéases intervenantes et à l'extrémité N-terminale.



Par l'utilisation d'un segment de lien bivalent comme l'éthanolamine ou le diamino-éthane, ce composé pourra aussi être introduit à l'extrémité C-terminale du lien peptidique clivable.

10

Dans les deux cas la molécule libérée dans l'environnement tumoral est un dérivé aminoacide hydrophobe comme par exemple le Leu-Melphalan ou le Chlorambucil-Leu. Ces composés peuvent traverser facilement de façon passive la membrane plasmique des cellules tumorales et agir sur les acides nucléiques soit directement puisque la fonction  
15 alkylante n'est pas modifiée soit après clivage de l'acide aminé supplémentaire par les peptidases ou estérases endogènes.

### Composés anti-inflammatoires

Dans un autre mode de réalisation particulier, la molécule biologiquement active présente  
20 des propriétés anti-inflammatoires.

### *Libération de peptides dérivés du segment N-terminal de l'annexine I.*

Un exemple de tels composés est un peptide, nommé ici NTA1, aux propriétés anti-  
25 inflammatoires identique à ou dérivé du segment N-terminal de l'annexine I. Les propriétés anti-inflammatoires de ce peptide résultent probablement de son action sur le récepteur du fMLP inhibant ainsi que le chimiotactisme et l'activation des cellules phagocytaires et en particulier leur dégranulation et leur production de métabolites toxiques de l'oxygène.

30

La séquence du segment N-terminal de l'annexine I humaine est la suivante :

AMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKSSKGGP (SEQ ID No 33)

- Dans un mode plus général de réalisation, le peptide anti-inflammatoire dérivé du segment N-terminal de l'annexine I sera avantageusement choisi parmi les séquences suivantes :

1	5	10	15	20	25	30	
<u>AMVSEFLKQAWFhaNpEQEYhpovKooKGGP</u>							
10	IN		YYIE	E	DCVQTTQSSHVV		(S7) (SEQ ID No 34)
		C	LD	Q	IKSS	TYS	
		M	L		NC	CVP	
					EA	GG	

- 15 La séquence soulignée représente une séquence dite consensus possédant les propriétés anti-inflammatoires recherchées. Sous chaque résidu variable de cette séquence est indiquée une liste de résidus pouvant remplacer celui indiqué dans la séquence consensus : a résidu acide ; h résidu hydrophobe ; p résidu polaire ; o Thr ou Ser de préférence.

- 20 Il est également possible de choisir une séquence plus courte pour NTA1. On peut ainsi supprimer les huit à treize premiers résidus. On pourra utiliser en particulier utiliser la séquence :

ENEEQEYVQTVKSSKGGP (SEQ ID No 35) (S8)

- 25 Toutes les mutations correspondant à ce fragment et indiquées pour la séquence (S7) seront utilisables dans la séquence S8.

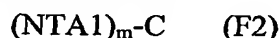
- Il existe dans l'environnement inflammatoire au moins une protéase susceptible de cliver spécifiquement le segment NTA1 au niveau de l'un des deux résidus Lysine 25 ou 28 présents dans sa partie N-terminale -Thr-Val-Lys-Ser-Ser-Lys-Gly-Gly-. Ces protéases sont normalement responsables de la libération *in vivo* du segment N-terminal de l'annexine I.

- Dans un premier mode simple de réalisation, le peptide NTA1 ou une version judicieusement mutée est simplement intégré à la partie N-terminale du segment C pour

former la protéine thérapeutique : NTA1-C. Le segment C est pris ici dans son acceptation la plus large et définie plus haut.

Dans un second mode de réalisation, le peptide NTA1 ou une version judicieusement mutée est relié au segment C par l'intermédiaire d'un lien simple clivable par une protéases intervenantes selon la formule F6A ou F6B ou d'un lien multiple comportant un élément de ramification D comme défini plus haut (F5A, F5B).

Dans un autre mode de réalisation, la partie A peut aussi contenir une répétition de l'une des séquences choisi pour le segment NTA1 afin d'augmenter la concentration locale du peptide anti-inflammatoire et donc son efficacité.



Pour optimiser le comportement *in vivo* de la molécule thérapeutique, on choisira de préférence  $m = 2$ .

Dans un autre mode de réalisation, il peut être avantageux de lier le segment NTA1 à l'extrémité C-terminale du segment C. Pour cette réalisation, on utilisera un lien bifonctionnel de façon à relier entre elles les extrémité C-terminales de C et NTA1 :



#### *Libération de Cytokines anti-inflammatoires.*

Les maladies inflammatoires chroniques, et particulièrement la polyarthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn et le Psoriasis, sont provoquées par un déséquilibre important dans la production dans l'environnement cellulaire d'un certain nombre de molécules de signalisation. L'amplification et la pérennisation du phénomène inflammatoire dans ces maladies résultent d'un équilibre complexe entre un nombre important de protéines aux influences opposées, molécules pro-inflammatoires et molécules anti-inflammatoires.

Parmi les cytokines jouant un rôle anti-inflammatoire, l'interleukine 10 (IL10) (SwissProt, P22301), ou sur l'une quelconque de ses isoformes, est la plus intéressante par l'effet régulateur qu'elle produit sur la réaction inflammatoire. Mais comme beaucoup de molécules de la signalisation de la réaction inflammatoire, l'IL10 possède de multiples

fonctions dont des fonctions de stimulation du système immunitaire. Il est donc très avantageux de cibler cette protéine au site inflammatoire proprement dit de façon à localiser strictement son action.

- 5 L'IL10 agit en tant qu'homodimère sur son récepteur hétéro tétramérique. La structure tridimensionnelle de l'IL10 et du complexe avec son récepteur, l'IL10R, offre un avantage supplémentaire. En effet, la structure du complexe IL10-IL10R, montre que les extrémités N et C-terminale de l'IL10 sont relativement proches dans sa structure. De plus l'extrémité N-terminale est enfouie au cœur du récepteur et l'extrémité C-terminale est située dans la
- 10 région de dimérisation de cette cytokine. De ce fait, le blocage par le segment C-L ou L-C de l'une des extrémités N ou C-terminale de l'IL10, interdit la formation du complexe et finalement bloque son action. L'activation de l'IL10 ne peut donc se faire que par l'action des protéases intervenantes de l'environnement inflammatoire qui ont pour effet de libérer cette cytokine exclusivement dans cet environnement.
- 15 Le même raisonnement peut être appliqué à une autre cytokine anti-inflammatoire, l'IL13 (P35225) ou à l'une de ses isoformes.

La molécule thérapeutique basée sur l'IL10 ou l'IL13 possède l'une des structures générales suivantes, selon le choix fait pour le positionnement de l'IL10 ou de l'IL13 :

- 20 C-L'1-L''1-L2-(IL10/IL13) (selon la formule F6A)  
(IL10/IL13)-L1-L''2-L'2-C (selon la formule F6B)

- Le site de clivage des protéases intervenantes est prévu entre L''1 et L''1 ou entre L''2 et L'2. La longueur du segment résiduel L''1-L2 ou L1-L''2 est telle qu'elle ne gêne pas la
- 25 formation du complexe IL10-IL10R ou IL13-IL13R $\alpha$ 1/2. Il est aisé d'ajuster la séquence effective de l'IL10 pour satisfaire cette contrainte. Dans l'un et l'autre cas le segment L1 ou L2 peut être absent.

#### *Libération d'inhibiteurs de Cytokines pro-inflammatoires.*

- 30 Le segment thérapeutique A peut être sélectionné parmi les inhibiteurs non activants des récepteurs membranaires des cytokines pro-inflammatoires.

Il existe des inhibiteurs naturels de certaines cytokines et notamment de l'interleukine 1 (IL1), une cytokine pro-inflammatoire dont l'incidence dans les maladies inflammatoires vient immédiatement après celle du TNF $\alpha$  qui est la cytokine dont le rôle est central.

L'inhibiteur soluble du récepteur de l'IL1, l'IL1R, est une petite protéine, le sIL1Ra (Swiss-Prot P18510), qui agit en se liant au IL1R sans l'activer, bloquant ainsi de l'IL1. L'efficacité du sIL1Ra a été testée dans diverses maladies et en particulier dans l'arthrite rhumatoïde et se montre relativement actif. Cependant les doses utilisées chez les malades en injections sous cutanées sont énormes, de 30mg à 150mg. La pharmacocinétique est par ailleurs défavorable puisque le temps de demie-vie dans la circulation n'est que de 21 min, ce qui est très faible pour une utilisation thérapeutique dans le cas de l'arthrite rhumatoïde.

Comme précédemment pour l'IL10, l'ensemble C-L-(IL1Ra) ou (IL1Ra)-L-C est totalement inactif. En effet, la structure du complexe IL1Ra-IL1R montre que les extrémités N et C-terminale de l'IL1Ra sont très proches dans la structure et sont enfouies au cœur du récepteur. De ce fait, l'activation de l'inhibiteur ne peut se faire que par l'action des protéases intervenantes de l'environnement inflammatoire qui ont pour effet de libérer l'inhibiteur exclusivement dans cet environnement.

15

La molécule thérapeutique basée sur l'IL1Ra ou sur l'une quelconque de ses isoformes, possède l'une des structures générales suivantes, selon le choix fait pour le positionnement de l'IL1Ra :

	C-L'-L''1-L2-(IL1Ra)	(selon la formule F6A)
20	(IL1Ra)-L1-L''2-L'2-C	(selon la formule F6B)

Le site de clivage des protéases intervenantes est prévu entre L''1 et L''1 ou entre L''2 et L'2. La longueur du segment résiduel L''1-L2 ou L1-L''2 est telle qu'elle ne gêne pas la formation du complexe IL1-IL1Ra. Comme pour l'IL10, il est aisé d'ajuster la séquence effective de l'IL1Ra pour satisfaire cette contrainte. Dans l'un et l'autre cas le segment L1 ou L2 peut être absent.

#### *Libération de médicaments anti-inflammatoires.*

30 Il existe de nombreuses molécules non peptidiques possédant des propriétés anti-inflammatoires importantes comme les Glucocorticoïdes, les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), le Méthotrexate.

a) *Les Glucocorticoïdes :*

Initialement, les Glucocorticoïdes sont des molécules hormonales naturelles produites par l'organisme et interviennent dans de nombreux processus physiologiques. Leur action est strictement intracellulaire et intervient par leur liaison à des récepteurs nucléaires induisant la transcription d'un certain nombre de gènes, d'où le rôle complexe de ces hormones à de multiples étapes de la réaction inflammatoire. L'utilisation des Glucocorticoïdes et de leurs dérivés non naturels comme médicament est donc toujours très délicate alors que leur efficacité peut être très grande. Leur ciblage et leur libération stricte dans l'environnement inflammatoire sont donc cruciaux.

Les Glucocorticoïdes sont des molécules stéroïdiennes, donc assez hydrophobes, et leurs action s'effectue au niveau du noyau cellulaire après diffusion passive à travers la membrane plasmique. Pour une utilisation comme médicament ciblé, les Glucocorticoïdes peuvent donc être simplement libérés dans l'environnement inflammatoire.

Toutes ces molécules comportent des fonctions chimiques, par exemple des groupes hydroxyles, permettant leur greffage sur des molécules peptidiques et en particulier sur un segment L clivable par des protéases intervenantes comme pour les composés anti-tumoraux.

La molécule thérapeutique basée sur les Glucocorticoïdes possède l'une des structures générales suivantes, selon le choix fait pour le positionnement de la molécule par rapport au segment de ciblage :

- 25    C-L'1-L''1-L2-(O-Glucocorticoïde)    (selon la formule F6A)  
      (Glucocorticoïde-O)-L1-L''2-L'2-C    (selon la formule F6B)

Sous cette forme ces molécules sont totalement inactives.

- 30 L'action des protéases intervenantes libère soit la molécule L''1-L2-(O-Glucocorticoïde) soit la molécule (Glucocorticoïde-O)-L1-L''2, c'est à dire une pro-drogue qui doit diffuser passivement dans les cellules environnantes où elles seront traitées par les protéases et estérases endogènes pour libérer finalement la molécule active.

Dans cette application particulière de la présente invention, il est donc important que les segments L''1-L2 ou L1-L''2 soit hydrophobes et les plus court possibles, compte tenu des capacités de clivage des protéases intervenantes. Il est avantageux de limiter à deux le nombre de résidus voire à un le nombre de résidus dans L''1 ou L''2. Il peut être aussi  
5 avantageux de ne pas introduire les segment L1 ou L2.

*b) Les anti-inflammatoires non stéroïdiens :*

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens forment une des classes de médicament les plus  
10 prescrits. Ce sont pour la plus part des inhibiteurs des cyclo-oxygénases (COX-1 et COX-2), des enzymes importantes intervenant dans le métabolisme de l'acide arachidonique. Ce sont des médicament généralement réservés au traitement des maladies inflammatoires sévères et utilisés à des doses généralement très élevées et donc génératrices d'effets secondaires indésirables. Parmi les AINS, il existe une classe de composés possédant une  
15 fonction carboxylique utilisable pour leur greffage sur des molécules peptidiques et en particulier sur un segment L clivable par des protéases intervenantes comme pour les composés anti-tumoraux ou anti-inflammatoires mentionnés plus haut. Parmi ces composés on mentionnera l'Aspirine, l'Olsalazine, le Diclofénac, l'Etodolac, le Sulindac, l'Idométacine, le Ténidap et l'ensemble des dérivés de l'acide propionique comme  
20 l'Ibuprofène, l'acide Tiaprofénique, le Naproxène, le Kétoprofène et d'une façon générale « profénides ». D'autres familles de composés sont aussi utilisables, les acides anthraniniliques et apparentés comprenant le groupe des fénamates comme l'acide méfénamique, le groupe des dérivés de l'acide nicotinique comme l'acide niflumique.

25 Comme l'ensemble de ces composés anti-inflammatoires sont des acides carboxyliques, ils devront être fixés à l'extrémité N-terminale du lien peptidique clivable selon la formulation suivante :



30 Cette configuration est avantageuse en ce qu'elle permet l'introduction de la molécule d'AINS directement en fin de synthèse peptidique en phase solide du segment L''2-L'2. Dans ce mode de réalisation, le segment L''2 devra être suffisamment court et hydrophobe pour permettre la diffusion passive du segment actif (AINS)-CONH-L''2 à travers la membrane plasmique des cellules cibles.

Si, pour des raisons particulières, il est nécessaire d'utiliser l'extrémité C-terminale selon la formule : C-L'1-L''1-L2-(AINS), le segment L2 devra dans ce cas être bi-fonctionnel et hydrophobe comme par exemple l'aminoéthanol :

5 L2 = H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH.

c) *Le méthotrexate*

Le méthotrexate possède également des propriétés anti-inflammatoires et peut être utilisé  
10 de la même façon que pour ses propriétés anti-tumorales décrites plus haut.

*Réalisation d'inhibiteurs des récepteurs membranaires de la famille des TNFR.*

L'homotrimérisation stricte des domaines extracellulaires en l'absence du ligand est un  
15 élément important du fonctionnement correct des TNFR. Cette trimérisation du récepteur vide est assurée essentiellement par un segment N-terminal comprenant le domaine extracellulaire CRD1. Les interactions protéine-protéine sont très spécifiques et évitent ainsi la formation d'hétérotrimères dus à la présence de récepteurs différents à la surface d'une même cellule. On met à profit cette propriété pour produire de nouveaux inhibiteurs  
20 spécifiques de n'importe quelle protéines membranaires de la famille des TNFR.

Ces inhibiteurs utilisent un peptide, nommé ici PCRD<sub>X</sub>, comprenant au moins le domaine CRD1 d'un TNFR quelconque X pour bloquer la trimérisation de celui-ci de façon très spécifique et donc bloquer sa fonction : en se liant à une sous unité membranaire du TNFR  
25 (monomère), le peptide PCRD<sub>X</sub> libre, sous la forme de monomère ou de dimère, bloque la trimérisation de cette sous unité membranaire sans activer le récepteur puisque celui-ci ne peut plus acquérir sa structure trimérique.

Dans un mode de réalisation simple, on pourra utiliser un peptide PCRD<sub>X</sub>, ou une version  
30 mutée de ce domaine, lié au segment C par un lien L1-L2 clivable par l'une des protéases intervenantes généralement présentes dans l'environnement inflammatoire de façon à ne libérer l'inhibiteur qu'au site inflammatoire ciblé. La structure générale de la molécule thérapeutique de la présente invention est donc :

C-L1-L2-PCRD<sub>X</sub> ou PCRD<sub>X</sub>-L1-L2-C

Où le clivage s'effectue entre L1 et L2.

La structure C- L1-L2-PCRD<sub>X</sub> est directement active car elle laisse libre l'extrémité C-terminale du CRD1 permettant sa liaison au CRD1 d'un récepteur cellulaire.

La structure PCRD<sub>X</sub>- L1-L2-C possède l'avantage supplémentaire de ne rendre actif le segment CRD1 que lorsque celui-ci est libéré par le clivage du segment L1-L2 limitant ainsi d'autant le risque d'effets secondaires. En effet dans cette configuration l'extrémité C-terminale du PCRD<sub>X</sub> est encombrée par la présence du segment L1-L2-C, inadapté à toute interaction avec un domaine extracellulaire d'un TNFR, rendant ainsi plus difficile l'interaction avec celui-ci. L'activité est recouvrée par le clivage du lien L1-L2.

La liste suivante donne des exemples de séquence minimum que doivent contenir les divers segments PCRD<sub>X</sub> possibles utilisables comme inhibiteur de la trimérisation du TNFR1 et du TNFR2 :

*Inhibiteur du TNFR1*

DSVCPQGKYI HPQNN<sub>S</sub>ICCT KCHKGTYLYN DCPGPGQDTD CRECESGSFT ASENHLRHCL  
20 SS (SEQ ID No 36)

*Inhibiteur du TNFR2*

PGTCRLREYY DQTAQMCCSK CSPGQHAKVF CTKTSDTVCD SCEDSTYTQL WNWVPECLSS  
25 (SEQ ID No 37)

Ces séquences peuvent être mutées, notamment dans la région d'interaction avec les récepteurs TNFR1 et du TNFR2 originaux, afin d'augmenter leur affinité avec ces récepteurs.

Des séquences analogues provenant de n'importe quel récepteur de cytokines de la famille des TNF peuvent être utilisées pour produire des inhibiteurs spécifiques de ces récepteurs.

Le lien clivable L1-L2 peut être avantageusement choisi parmi les séquences peptidiques reconnues et clivées par les protéases spécifiques dont le rôle est de libérer la partie extracellulaire des TNFR membranaires ou des précurseurs membranaires des TNF. Ces protéases appartiennent à la famille des ADAM déjà mentionnées. Parmi ces protéases, on

choisira en particulier la protéase ADAM-17 ou TACE spécifique de la libération du  $\text{TNF}\alpha$  et du  $\text{TNF}\beta$  ( $\text{LT}\beta$ ) et on choisira en conséquence la séquence du segment L1-L2 de telle sorte qu'il contienne l'une des séquences suivantes :

- 5 L1\*L2 = SPLAQA\*VRSSSR (SEQ ID No 38) ou fragments de celle-ci, PLAQA\*VRSSS (SEQ ID No 39), LAQA\*VRSS (SEQ ID No 40), AQA\*VRS (SEQ ID No 41), QA\*VR (SEQ ID No 42), ou toute combinaison des groupes de séquences situées de part et d'autre du site de clivage marqué par une astérisque comme par exemple . PLAQA\*VRS (SEQ ID No 43) ou AQA\*VRSS (SEQ ID No 44), etc.

10

#### UTILISATIONS DES MOLECULES DE CIBLAGE ET DE LIBERATION DE COMPOSE THERAPEUTIQUE

Les molécules de l'invention peuvent être construites pour cibler différents types de  
15 cellules ou de tissus pathologiques, de préférence chez l'homme. Elles peuvent être utilisées pour la préparation de médicaments et/ou dans des méthodes de traitement thérapeutique.

Ainsi, un objet particulier de l'invention consiste en une composition pharmaceutique  
20 comprenant une molécule chimère telle que définie ci-avant.

Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation d'une molécule chimère telle que définie ci-avant pour la préparation d'un médicament. Dans un mode préféré de réalisation, ces médicaments sont des médicaments anti-tumoraux ou anti-inflammatoires.

25

Lorsque le composé thérapeutique A est un anti-inflammatoire, les molécules selon l'invention peuvent être utilisée pour la préparation de médicaments destinés à des pathologies aiguës comme l'asthme, la rectocolite hémorragique, la maladie de Crohn, le choc septique, les maladies du collagène et l'arthrite.

30

Lorsque le composé thérapeutique A est un anti-cancéreux, l'invention est utilisable pour le traitement de différentes tumeurs, notamment de tumeurs solides ou liquides ou hématopoïétiques, en particulier de cancers du sein, du poumon, de l'intestin, du colon et

du rectum, du cerveau, des méninges, de l'estomac, de l'oesophage, du foie, du pancréas, de la vessie, tête-et-cou, des appareils reproductifs mâles ou femelles, de la peau, etc.

Les compositions pharmaceutiques de l'invention peuvent comprendre tout excipient ou  
5 véhicule acceptable sur le plan pharmaceutique, tel que sel, solutés, etc. Il peut s'agir de solutions salines, tamponnées, isotoniques, d'eau, etc. Les compositions peuvent comprendre, en outre, d'autres agents actifs, utilisés en combinaison, de manière simultanée, séparée ou espacée dans le temps.

10 Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation des molécules de ciblage telles que définies ci-avant pour la délivrance locale de principes actifs dans le voisinage de tissus pathologiques chez des sujets.

La présente invention concerne en outre des méthodes de traitement d'une pathologie chez  
15 un sujet comprenant l'administration d'une molécule ou d'une composition telles que définies ci-avant. De préférence, la pathologie concernée est un cancer ou une inflammation. La méthode de traitement peut comprendre en outre une étape préalable consistant en un traitement permettant de générer des cellules engagées dans un processus d'apoptose dans le tissu pathologique. Elle concerne également des méthodes de délivrance  
20 locale de principes actifs dans le voisinage de tissus pathologiques chez des sujets, comprenant l'administration d'une molécule ou d'une composition telles que définies ci-avant.

Dans le contexte de l'invention, le terme « traitement » désigne le traitement préventif,  
25 curatif, palliatif, ainsi que la prise en charge des patients (réduction de la souffrance, réduction de la taille d'une tumeur ou de la progression de la pathologie, amélioration de la durée de vie, ralentissement de la progression de la maladie, diminution du site inflammatoire), etc. Le traitement peut en outre être réalisé en combinaison avec d'autres agents ou traitements (chimiothérapie, radiothérapie, thérapie génique, etc.). Les  
30 traitements et médicaments de l'invention sont tout particulièrement destinés aux humains.

Pour la mise en œuvre des méthodes thérapeutiques définies ci-avant, le composé thérapeutique peut être utilisé à différentes doses et selon différents protocoles. L'administration peut être réalisée par toute méthode connue de l'homme du métier, de

préférence par injection, typiquement par voie intra-péritonéale, intra-tumorale, intra-dermique, intra-cérébrale, intra-veineuse, intra-artérielle ou intra-musculaire. Les doses administrées peuvent être adaptées par l'homme de l'art. Typiquement, de 0,01 mg à 100 mg / kg environ sont injectés. Il est entendu que des injections répétées peuvent être  
5 réalisées. L'invention est utilisable chez les mammifères, notamment chez l'être humain.

### EXEMPLES

*Exemple 1 : Exemple de réalisation de segments L clivables pour la libération de*  
10 *composés anti-tumoraux et anti-inflammatoires :*

Si le segment L est uniquement peptidique et ne contient que des résidus naturels, il sera de préférence intégré dans le segment C à son extrémité N ou C-terminale par les méthodes classique de la biologie moléculaire. Il pourra cependant être intégré si nécessaire au  
15 segment A si celui est peptidique et obtenu par biologie moléculaire.

Dans un mode de réalisation particulier, il y aura avantage à préparer de façon extemporanée le segment L ou l'ensemble L-A sous une forme réactive pour une liaison ultérieure au segment C. Un exemple intéressant se présente dans le cas où un groupe thiol  
20 amené par un résidu Cystéine est présent dans le segment C, de préférence loin du site de liaison de C aux membranes chargées négativement. Ce groupe thiol permet, par une réaction chimique simple, rapide et totale, de lier l'ensemble L-A muni du groupe fonctionnel maléimide.

25 Le protocole de synthèse est décrit dans la figure 1. Le fragment L consiste en un peptide protégé lié à une résine acide-labile rink via la stratégie FMOC bien connue de l'homme de l'art. Le fragment réactif possède la propriété de former une liaison covalente avec un groupe nucléophile – ici le groupe SH d'une Cystéine - de la protéine C. Le groupe réactif peut être un bromoacétamide ou, comme ici et de façon plus avantageuse, un groupe  
30 maléimide. Le groupe espaceur entre le maléimide et le peptide L peut être un groupe alkyl, alkoxy ou poly alkoxy terminé par une fonction carboxylique pour le couplage à L. Dans l'exemple de la figure 1, le segment thérapeutique est un composé anti-tumoral de la famille de antracycline, la doxorubicine. Dans la figure 1, AA représente n'importe quelle

séquence d'acides aminés pouvant constituer un lien clivable. L'exemple décrit ci-dessous correspond à la séquence AA = Gly-Ser-Gly-Val-Leu.

**Synthèse du Fmoc-Leu-Résine rink acide (1) :**

- 5 5 g de résine rink 100-200 Mesh (approximativement 0,35-0,80 mmole/g), Fmoc-Leu-OH (3,2 mmol) et la DCCI (3,37 mmol) sont agités pendant 5 minutes de 0°C à 5°C dans 50 ml de DCE, puis 60 mg de DMAP (0,5 mmol) sont ajoutés et après 20 minutes supplémentaires à 5°C, 275 µl de N-méthylmorpholine (2,5 mmol) sont ajoutés. Le mélange est agité pendant 4 heures. La résine filtrée est lavée avec 40 ml (pour 30 s chaque
- 10 fois) par les solvants suivants : 3 fois méthanol, 3 fois DCE, 3 fois DMA. Les groupes hydroxyle non réagis de la résine sont bloqués avec l'anhydride acétique (13,5 mmol) dans 3 ml de pyridine et 15 ml de DMA puis la résine est lavée comme suit (40 ml chaque fois) : 2 fois isopropanol, 3 fois DMA, 2 fois isopropanol, 6 fois DCE, 2 fois isopropanol, 3 fois DMA, 3 fois isopropanol. La résine est ensuite séchée sous vide et a un contenu en
- 15 Fmoc d'environ 0,35 mmole/g.

**Synthèse du Fmoc-Gly-Ser(Trt)-Gly-Val-Leu-Résine rink acide (2) :**

*Lavage et enlèvement du groupe Fmoc à température ambiante :*

- 1 g de Fmoc-Leu-Résine rink acide (0,35 mmol) est traité de la façon suivante chaque fois
- 20 3 minutes avec 20 ml de 1 fois isopropanol, 4 fois DMA, 6 fois 20% pipéridine dans le DMA, 2 fois DMA, 1 fois isopropanol, 4 fois DMA.

*Couplage Fmoc-AA<sub>n</sub>-OH :*

- DIEA (3,5 mmol) dans 10 ml de DMA est ajouté à la résine. Après le gonflement de la résine, les acides aminés protégés par le Fmoc (1,75 mmol) et le HBTU (1,72 mmol)
- 25 dans du DMA sont ajoutés. Après 40 minutes la résine est rincée avec 4 fois 40 ml de DMA.

**Synthèse du H-Gly-Ser(Trt)-Gly-Val-Leu-Résine rink acide (3) :**

- La forme N-terminale libre du peptide protégé et lié à la résine est obtenue par le protocole
- 30 de clivage et lavage identique au protocole (2)°.

**Synthèse du composé réactif (4) :**

A 1 g de résine (3) (3,5 mmoles dans le DMA) on ajoute 3,5 mmoles de DIEA, 1,75 mmoles de N-maléoyl- $\beta$ -alanine et 1,72 mmoles de HBTU. Après 2 heures, la résine est lavée avec 4 fois 20 ml de DMA puis séchée sous vide.

**5 Séparation du peptide protégé de la résine pour obtenir (5) :**

La résine est dispersée dans le DCM et traitée par 20 ml de mélange de clivage AcOH/DCM (10/90 v/v) pendant une heure puis est filtrée, lavée 3 fois avec 20 ml de mélange de clivage puis 3 fois 20 ml de DMA pour extraire le peptide de la résine. De l'hexane (15 fois le volume) est ajouté au filtrat pour enlever l'acide acétique sous forme azéotrope. Le peptide protégé résultant est séché sous vide et purifié par chromatographie « flash ».

**Couplage du peptide protégé au composé anti-tumoral doxorubicine :**

A l'abri de la lumière, on ajoute au composé (5) (0,3 mmole dans 2 ml de DMA), 3 mmoles de DIEA, 0,3 mmole de HBTU et 0,3 mmole de Doxorubicine. Après 2 heures, le solvant est évaporé et le produit brut est dilué dans l'acétonitrile, purifié par chromatographie « flash » sur gel de silice.

**Synthèse du composé final (7) :**

A l'abri de la lumière, le composé (6) est dilué dans une solution à 1% de TFA et 5% de triéthylsilane dans le DCM. Après 2 heures, le produit brut est évaporé sous vide puis dissout dans l'acétonitrile, purifié par HPLC et lyophilisé.

*Exemple 2 : Synthèse d'un lien mixte peptidique et non-peptidique pour la libération de composés anti-tumoraux.*

La partie non peptidique du lien est introduit à l'aide du composé (12), obtenu selon le schéma de la figure 2, en remplacement de la N-maléoyl- $\beta$ -alanine utilisée dans la synthèse précédente (figure 1). Le schéma de la figure 2 décrit un lien de structure générale et le protocole qui suit décrit le cas particulier  $m=1$ ,  $n=2$ ,  $o=1$ .

A une solution de 2-(2-aminoethoxy)-éthanol (47,55 mmol) (8) dans 100 ml de dichlorométhane, on ajoute au goutte à goutte à 0°C une solution de t-butylpyrocarbonate (47.55 mmol) dans 50 ml de dichloromethane. On laisse remonter à température ambiante

et après deux heures, on évapore à sec le mélange réactionnel. On obtient le carbamate désiré (9) sous forme d'une huile incolore.

A une solution de  $\text{PPH}_3/\text{DIAD}$  (7.5 mmol) dans 25ml de THF fraîchement distillé est ajouté, à 0°C, l'alcool néopentylique (7.5 mmol), le carbamate précédent (9) (7.5 mmol) et le maléimide (7.5 mmol). On laisse ensuite la réaction à température ambiante pendant la nuit. Le brute réactionnel est évaporé à sec puis flash chromatographié sur silice pour donner le produit attendu (10).

10 A une solution du carbamate précédent (10) (6.5 mmol) dans 40 ml de dichlorométhane est ajouté 30 ml d'acide trifluoroacétique. La mixture est laissée aux ultrasons 10 minutes puis agitée à température ambiante 1 heure. Les solvants sont évaporés et le résidu lavé au chloroforme (3x) et à l'éther (4x). Le produit obtenu (11) sous forme de trifluoroacétate est utilisé tel quel à l'étape suivante.

15

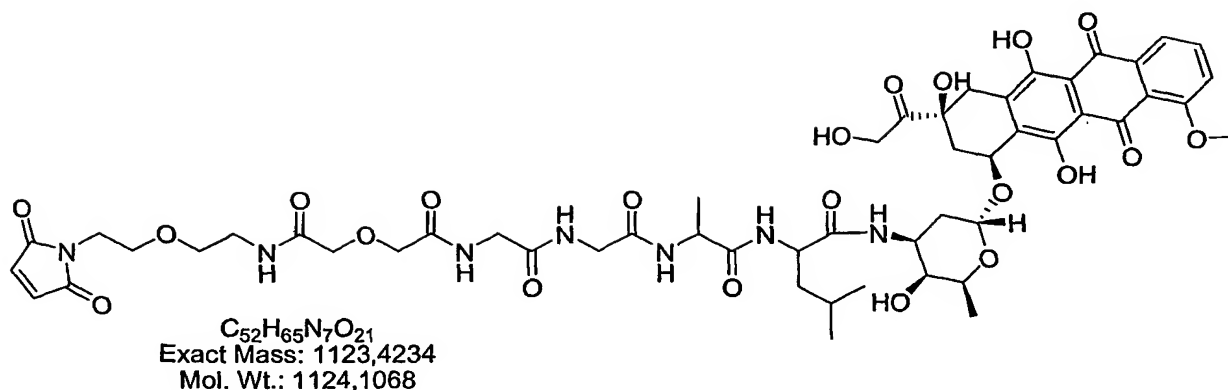
Au sel de trifluoroacétate du produit précédent (11) (6 mmol) en suspension dans le dichlorométhane (30mL), est ajouté à température ambiante le DIEA (12 mmol). Après une heure, on ajoute l'anhydride diglycolique (6.5 mmol). Après deux heures, on évapore à sec et on purifie le produit (12) par flash chromatographie sur silice.

20

Le composé (12) est ensuite utilisé comme le composé N-maléoyl- $\beta$ -alanine pour la synthèse d'un lien clivable mixte selon le protocole décrit dans la Figure 1 pour les composés (5) et (6).

25 *Exemple 2b : Synthèse d'un bras comportant un groupe d'espacement et un groupe peptidique clivable et couplage d'une part à une molécule de ciblage C et d'autre part à la doxorubicine.*

Le composé (12) de la Figure 2 avec  $n=2$ ,  $M=1$  et  $o=1$  a été couplé au peptide  $\text{AAn} = \text{Gly-Gly-Ala-Leu}$  selon la méthode décrite précédemment (Exemple 2). La molécule obtenue a été couplée à la doxorubicine selon la méthode décrite dans l'exemple précédent (Figure 1) pour obtenir le composé (12) suivant :



## Composé (12)

5

Le composé 12 a ensuite été couplé à un segment de ciblage C-SH de la famille (S5) grâce au groupe SH que celui-ci comporte et selon le protocole général suivant :

A 4,5mg de C-SH lyophilisé (1 équivalent) dans 5,4mL de tampon PBS (pH = 6.7) dégazé à l'azote, on a ajouté une solution de 1 équivalent de (12) (0,54 mg) dans 540μL de  
 10 DMSO. On a laissé la réaction se poursuivre 1h à température ambiante puis le mélange réactionnel a été lyophilisé.

Le lyophilisat a été repris dans un mélange H<sub>2</sub>O /DMSO 50/50 (2mL) et a été purifié par HPLC (colonne Source 15RPC 10x250 mm). La fraction correspondant au composé final  
 15 C-S-(12) a été collectée puis lyophilisée.

Le composé final C-S-(12) a été ultérieurement soumis à l'action des différentes protéases (MMP2, MMP3 et MMP9) selon le protocole suivant :

20 On a préparé une solution de C-S-(12) (60μM) soit 0,6mg dans 1mL dans un tampon Tris-HCl 50mM pH=7,5. On a séparé ce lot en 3 aliquots de 330μL chacun. A chaque aliquot, on a ajouté une des MMP après activation (MMP2, MMP3 et MMP9) environ 0,5μg de chaque enzyme. On a laissé incuber 5 heures à température ambiante. Les aliquots ont ensuite été purifiés par HPLC et les différents pics absorbants à 495nm ont été analysés en  
 25 ESI-TOF.

*Exemple 3 : Construction et production anti-inflammatoire NTA1-C.*

Deux constructions sont proposées qui correspondent l'une à la version longue de NTA1 nommé NTA1l, selon la séquence S7 (Seq ID 33) et l'autre à la version courte, nommé NTA1c, selon la séquence S8 (Seq ID 35).

NTA1c + :  
 5' P-CGAAAACGAAGAACAGGAATACGTTTCAGACCGTTAAATCTTCTAAAGGTGGTCCGG-3'  
 (SEQ ID No 45)

NTA1c - :  
 5' P-GATCCCGGACCACCTTTAGAAAGATTTAACGGTCTGAACGTATTCCTGTTCTTCGTTTTTCGGGCC-3'  
 (SEQ ID No 46)

NTA1l + :  
 5' P-CGCTATGGTTTTCTGAATTCCTGAAACAGGCTTGGTTCATCGAAAACGAAGAACAGGAATACGTTTCAGACCGTTAAATCTTCTAAAGGTGGTCCGG-3'  
 (SEQ ID No 47)

NTA1l - :  
 5' P-GATCCCGGACCACCTTTAGAAAGATTTAACGGTCTGAACGTATTCCTGTTCTTCGTTTTTCGATGAACCAA GCCTGTTTCAGGAATTCAGAAACCATAGCGGGCC-3'  
 (SEQ ID No 48)

Ban II + :  
 5' -GCGCTGTTAGCGGGTCCATTAAGTTCTGTC-3'  
 (SEQ ID No 49)

Ban II - :  
 5' -GACAGAACTTAATGGACCCGCTAACAGCGC-3'  
 (SEQ ID No 50)

Les plasmides pGEX 6P1 utilisés sont commerciaux (Amersham biosciences) ainsi que les enzymes (Biolabs) utilisés : BamH I, EcoR I, Ban II, T4 DNA Ligase, CIP, T4 kinase.

**Construction de NTA1c-C et NTA1l-C dans pGEX 6P**

Le vecteur d'expression utilisé est le vecteur pGEX 6P1 (Amersham-Biosciences). Ce vecteur permet l'expression de la protéine d'intérêt fusionnée à la GST à son extrémité Nter. La protéine d'intérêt est récupérée sans protéine de fusion après digestion par la PreScission. La séquence codante du segment C (provenant du vecteur pGEX2T, construit

au laboratoire) sera insérée dans ce vecteur entre les sites BamH I et EcoR I. Le segment NTA11 ou NTA1c sera ensuite inséré sous forme de cassettes dans le vecteur pGEX 6P contenant la séquence codante du segment C entre les sites Ban II et BamH I.

- 5 Le vecteur pGEX 6P possède deux sites Ban II. La première étape consiste donc à rendre ce site unique afin de l'utiliser comme site de clonage du segment NTA1. Le site Ban II situé en position 3890 est enlevé par une étape de mutagenèse dirigée silencieuse (kit Quick Change, Stratagène, oligos Ban II + et Ban II -) en suivant les recommandations du fournisseur. Le plasmide « pGEX-6P-mut » est alors obtenu.

10

- La séquence codante du segment C est extraite du plasmide pGEX2T par digestion enzymatique à l'aide des enzymes de restriction BamH I et EcoR I (Biolabs). Brièvement, 20 µg d'ADN est digéré séquentiellement par 200 U d'enzyme, à 37°C pendant la nuit. Après chaque digestion, l'ADN est purifié après migration sur gel d'agarose à l'aide du kit
- 15 « GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit » (Amersham-Biosciences). 20 µg de plasmide « pGEX-6P-mut » est également digéré dans les mêmes conditions par BamH I et EcoR I afin d'obtenir le vecteur dans lequel les séquences codantes seront insérées. Afin d'éviter une recircularisation du vecteur, celui-ci est déphosphorylé par une incubation de 2h à 37°C en présence de 2 U de CIP (Biolabs). Le vecteur « pGEX-6P-mut », ouvert en
- 20 BamH I / EcoR I et déphosphorylé, est ensuite purifié à l'aide du kit Amersham. La ligation de la séquence codante du segment C (10 moles d'insert pour 1 mole de vecteur) dans le vecteur « pGEX-6P-mut » est ensuite réalisée par incubation de 2h à température ambiante en présence de 400 U de T4 DNA ligase (Biolabs). Les plasmides pGEX-6P-mut contenant la séquence codante du segment C sont alors obtenus.

25

- Les cassettes « NTA11 » et « NTA1c » sont obtenues par hybridation de 100 pmol des oligos complémentaires (NTA1c + / NTA1c - et NTA11 + / NTA11 -) à 95°C pendant 5 min dans un tampon Tris HCl 20 mM pH7,5 ; NaCl 300 mM ; EDTA 1 mM. Les extrémités 5' des cassettes sont ensuite phosphorylées par une incubation à 37°C pendant
- 30 2h en présence de 50 U de T4 polynucléotide kinase (Biolabs). L'enzyme est inactivée par incubation à 65°C pendant 20 min.

La dernière étape consiste à digérer les plasmides pGEX-6P-mut la séquence codante du segment C par Ban II et BamH I afin d'insérer les cassettes. 20 µg d'ADN est digéré

séquentiellement par 50 U de Ban II et 100 U de BamH I, à 37°C pendant la nuit. Après chaque digestion, l'ADN est purifié après migration sur gel d'agarose à l'aide du kit Amersham. La déphosphorylation des vecteurs est réalisée par incubation à 37°C pendant 1h en présence de 10 U de CIP, afin d'éviter leur recircularisation lors de l'étape de  
5 ligation. La ligation des cassettes dans les vecteurs est réalisée comme décrite précédemment. On obtient donc les séquences NTA1c-C et NTA1l-C clonées dans le vecteur pGEX-6P-mut.

Après chaque construction les séquences d'ADN sont vérifiées avec le kit de séquençage  
10 Big Dye Terminator, Perkin-Elmer Applied Biosystems, sur un séquenceur Perkin-Elmer Abiprism 310, selon le protocole du fournisseur.

#### **Expression de NTA1c-C et NTA1l-C chez E. coli**

L'expression est réalisée chez une souche d'E. coli BL21 gold (Stratagène) à 30°C. Les  
15 bactéries sont mises en culture dans un milieu Luria Berthani (Gibco) contenant 150 mg/L d'ampicilline. Lorsque la turbidité des cultures atteint une densité optique à 600 nm (DO<sub>600</sub>) de 0,6, l'expression des protéines est induite par l'ajout de 1 mM IPTG (Sigma) et maintenue pendant 4h. Les bactéries sont alors centrifugées à 5,000 rpm (centrifugeuse JLA1.8000, Beckman) pour 10 min à 4°C et re-suspendues dans 20 mL de tampon S  
20 complet (20 mM Tris-HCl pH 7,6 ; 500 mM NaCl ; 1 mM EDTA ; 2% glycérol (v/v) ; 1% triton X100 (v/v)) supplémenté avec 0,1 mM de PMSF (Sigma) en éthanol ; 0,5 mM de DTT (Sigma) et 50 mg de lysozyme (Sigma). Après une incubation d'1h à 4°C, les extraits sont homogénéisés par 10 sonications de 1 min (amplitude 65%, 1 sec sonication, 1 sec repos) avec un repos d'1 min entre chaque sonication. Les protéines présentes dans la  
25 fraction soluble (surnageant) sont alors récupérées par centrifugation à 20,000 g, pendant 45 min à 4°C.

#### **Purification de NTA1c-C et NTA1l-C sur colonne GSTrap**

10 mL de la fraction soluble est prélevée et diluée dans 20 mL de tampon de liaison (50  
30 mM Tris-HCl pH7,5 ; 150 mM NaCl). Les protéines sont alors purifiées par chromatographie d'affinité sur colonne GSTrap Fast Flow (Amersham-Biosciences). Une colonne de 5 mL est préparée suivant les instructions du fabricant. L'échantillon protéique (30 mL) est chargé sur la colonne et cette dernière est lavée avec 10 volumes de tampon de liaison. Après un lavage supplémentaire avec 10 volumes de tampon de coupure (50 mM

Tris-HCl pH7,5 ; 150 mM NaCl ; 1 mM EDTA ; 1 mM DTT), la protéine est incubée directement sur la colonne avec 100 U de PreScission (Amersham-Biosciences) à 4°C pendant 20h. La protéine d'intérêt sans partenaire de fusion est ensuite récupérée par lavage avec 15 mL de tampon de coupure.

5

#### **Purification de NTA1c-C et NTA1l-C par gel filtration**

Une colonne HiLoad 26/60 Superdex 75 (300 mL) (Amersham-Biosciences) est équilibrée à l'aide de 2 volumes de tampon A (bicarbonate d'ammonium 150 mM pH 7,9). La protéine issue de la purification par GSTrap est alors injectée, et son élution est réalisée  
10 avec 2 volumes de tampon A. La protéine ainsi purifiée est aliquotée, lyophilisée et conservée à 20°C.

#### **Figures**

15 Figure 1 : Synthèse de la prodroque avec  $AA_n = \text{Gly-Ser-Gly-Val-Leu}$  comme substrat pour la MMP2, MMP3 et MMP9 et la N-maleoyl-beta-alanine comme segment réactif de liaison.

Figure 2 : Synthèse du lien non-peptidique long en remplacement du lien court de la N-  
20 maleoyl-beta-alanine utilisé dans le protocole précédent. Synthèse à partir de la 2-(2-aminoethoxy)-éthanol (8) ( $m=1$ ,  $n=2$ ,  $o=1$ )

Abbreviations : AcOH : acide acétique ; DCCI : N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide ; DCE :  
1,2 Dichloroéthane ; DCM : Dichlorométhane ; DIEA : Diisopropylsilane ; DMA :  
25 Diméthylacétamide ; DMAP : 4-Diméthylaminopyridine ; HBTU : 2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium hexafluorophosphate ; TFA : acid trifluoroacétique

## REVENDICATIONS

5 1- Molécule comprenant trois segments :

- un segment de ciblage C capable de se lier aux membranes de cellules engagées dans un processus d'apoptose ;
  - un segment thérapeutique A comprenant un composé biologiquement actif ; et
  - un segment de liaison L entre le segment de ciblage et le segment thérapeutique,
- 10 ladite liaison étant clivable in vivo dans l'environnement d'un tissu ou d'une cellule en apoptose.

2- Molécule selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit segment de liaison L comprend une fonction chimique reconnue et clivée par une enzyme ou un ensemble

15 d'enzymes spécifiques de l'environnement des cellules ciblées.

3- Molécule selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que ledit segment de liaison L comprend une séquence reconnue et clivée par une protéase majoritairement présente dans le tissu ciblé, plus particulièrement choisie parmi une métallo-protéase de la matrice extra-

20 cellulaire, une urokinase, et une protéase spécifique du clivage du segment extracellulaire des cytokines membranaires ou de leurs récepteurs.

4- Molécule selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que ledit segment de liaison L comprend une séquence sélectionnée en ce qu'elle contient au moins un couple

25 de résidus B1-B2 donné dans le tableau suivant :

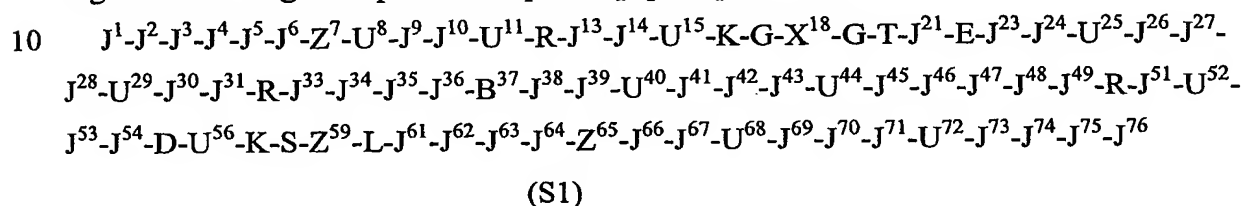
B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>
Val/Ala/Leu/Met	X
Leu/Tyr/Phe	X
Ala	Leu
Leu	Val
Val	Cys
Gly	Leu/Ile

Gly	Val
Ala	Val
Asn	Val
Arg	Phe
Gly/Ala/Asn/Glu/Gln/Pro/Arg/His/Asn	Hydrophobes naturels ou non
Polaires : Arg/Asp/Glu/Gln/Thr/Asn Hydrophobe : Ala	Hydrophobes naturels ou non

où X est résidu aminoacide quelconque naturel ou non.

5- Molécule selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que ledit segment de ciblage C est capable de se lier aux membranes comportant des lipides dont la charge électrostatique totale est négative, notamment la phosphatidylsérine.

6- Molécule selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que ledit segment de ciblage comprend la séquence peptidique suivante :



dans laquelle J, Z, U, X, et B représentent des acides aminés tels que :

- 15 - les acides aminés J sont choisis indépendamment les uns des autres parmi les acides aminés naturels, ou des dérivés de ceux-ci, de telle manière qu'au moins 50 % d'entre eux sont des résidus polaires choisis parmi R, N, D, C, Q, E, G, H, K, Orn, P, S, T et Y,  
- les acides aminés U sont choisis parmi A, C, G, I, L, M, F, W, Y, et V,  
- l'acide aminé X<sup>18</sup> est choisi indépendamment des autres acides aminés de la séquence  
20 parmi A, N, C, Q, G, H, I, L, M, F, S, T, W, Y et V,  
- l'acide aminé B<sup>37</sup> est choisi indépendamment des autres acides aminés de la séquence parmi R, A, C, G, I, L, M, F, W, Y, et V,  
- l'acide aminé Z<sup>7</sup> est choisi indépendamment des autres acides aminés de la séquence parmi D et E,  
25 - les acides aminés Z<sup>59</sup> et Z<sup>65</sup> sont choisis indépendamment parmi E, D, K, et R,  
les exposants indiquant la position des acides aminés dans la séquence.

7- Molécule selon la revendication 6, caractérisée en ce que les acides aminés U et B sont choisis suivant un des exemples exposés ci-dessous :

	U <sup>8</sup>	U <sup>11</sup>	U <sup>15</sup>	U <sup>25</sup>	U <sup>29</sup>	B <sup>37</sup>	U <sup>40</sup>	U <sup>44</sup>	U <sup>52</sup>	U <sup>56</sup>	U <sup>68</sup>	U <sup>72</sup>
Ex 1	V	L	M	I	L	R	I	Y	L	L	V	L
Ex 2	A	I	I	I	L	R	I	Y	L	L	I	L
Ex 3	A	I	I	I	L	R	I	Y	L	L	M	V
Ex 4	A	L	M	L	L	R	I	Y	L	L	I	M
Ex 5	A	L	M	I	I	R	V	Y	L	L	I	M
Ex 6	A	L	M	I	I	R	I	F	L	L	I	M
Ex 7	A	L	M	I	V	R	I	F	L	L	I	F
Ex 8	V	L	M	I	L	R	I	F	L	L	I	M
Ex 9	A	L	M	I	L	R	I	F	L	L	I	M
Ex10	A	L	M	I	L	R	I	Y	L	L	A	A
Ex11	V	L	M	I	L	R	I	Y	L	L	V	L
Ex12	V	L	M	I	L	R	I	F	L	L	V	L

8- Molécule selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que ledit segment de ciblage C comprend une séquence sélectionnée parmi le groupe constitué des séquences SEQ ID Nos 23-32.

5

9- Molécule selon l'une des revendications 1-5, caractérisée en ce que ledit segment de ciblage C comprend la séquence de tout ou partie d'une annexine, d'un domaine de type C1 ou C2 des facteurs de coagulation sanguine, d'un domaine V d'une protéine de la famille des 2-Glycoprotéines-I, d'un domaine de type FYVE, d'un domaine de type PH, ou  
 10 un fragment ou un dérivé présentant au moins 50 % d'identité.

10- Molécule selon la revendication 9, caractérisée en ce que ledit segment de ciblage C comprend une séquence sélectionnée parmi les séquences SEQ ID Nos 1-16 et 17-22, de préférence SEQ ID Nos 2-4, 6-8, 10-12, 14-16 et 19-22 ou un fragment de celle-ci.

15

11- Molécule selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que ledit segment thérapeutique A présente une activité anti-tumorale.

12- Molécule selon la revendication 11, caractérisée en ce que ledit segment thérapeutique  
 20 A est sélectionné parmi le groupe constitué d'une molécule de la famille des TNF $\alpha$  ou dérivés de ceux-ci (TRAIL-Do), d'une molécule d'IL4 humaine ou de l'une de ses

isoformes, d'une molécule de la famille des anthracyclines ou l'un de ces dérivés actifs, de préférence la doxorubicine, d'une molécule de taxane comme le paclitaxel ou le docetaxel ou l'un de ces dérivés actifs, d'une molécule de méthotrexate ou l'un de ces dérivés actifs, du 2-méthoxyestradiol ou l'un de ces dérivés actifs, de molécules de la famille des antipyrimidines comme la cytosine arabinoside ou la difluoro-déoxy-cytidine ou l'un de ces dérivés actifs, de molécules de la famille des agents alkylants dérivés des moutardes à l'azote comme la phénylalanine-moutarde (Melphalan) ou d'un dérivé comme le Chlorambucyl.

10 13- Molécule selon l'une des revendications 1-10, caractérisée en ce que ledit segment thérapeutique A présente une activité anti-inflammatoire.

14- Molécule selon la revendication 13, caractérisée en ce que ledit segment thérapeutique A est sélectionnée parmi le groupe constitué par un segment N-terminal de l'annexine I humaine, en particulier NTA1, les cytokines anti-inflammatoires, et en particulier l'IL10 et l'IL13 ou l'un de leurs mutants appropriés, les inhibiteurs non activants des récepteurs membranaires des cytokines pro-inflammatoires comme en particulier l'inhibiteur du récepteur de l'IL1 ou un mutant approprié de cet inhibiteur, les glucocorticoïdes, les anti-inflammatoires non stéroïdiens ou de leurs dérivés considérés comme des inhibiteurs des enzymes cylo-oxygénase 1 et 2, et le Méthotrexate, un inhibiteur des récepteurs membranaires de la famille des TNFR, en particulier des peptides contenant ou moins le domaine extracellulaire CRD1 correspondant.

15- Composition pharmaceutique comprenant une molécule selon l'une des revendications précédentes.

16- Utilisation d'une molécule selon l'une des revendications 1-14 pour la fabrication d'un médicament.

17- Utilisation d'une molécule selon la revendication 11 ou 12 pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement du cancer.

18- Utilisation d'une molécule selon la revendication 13 ou 14 pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement d'une maladie inflammatoire.

1/2

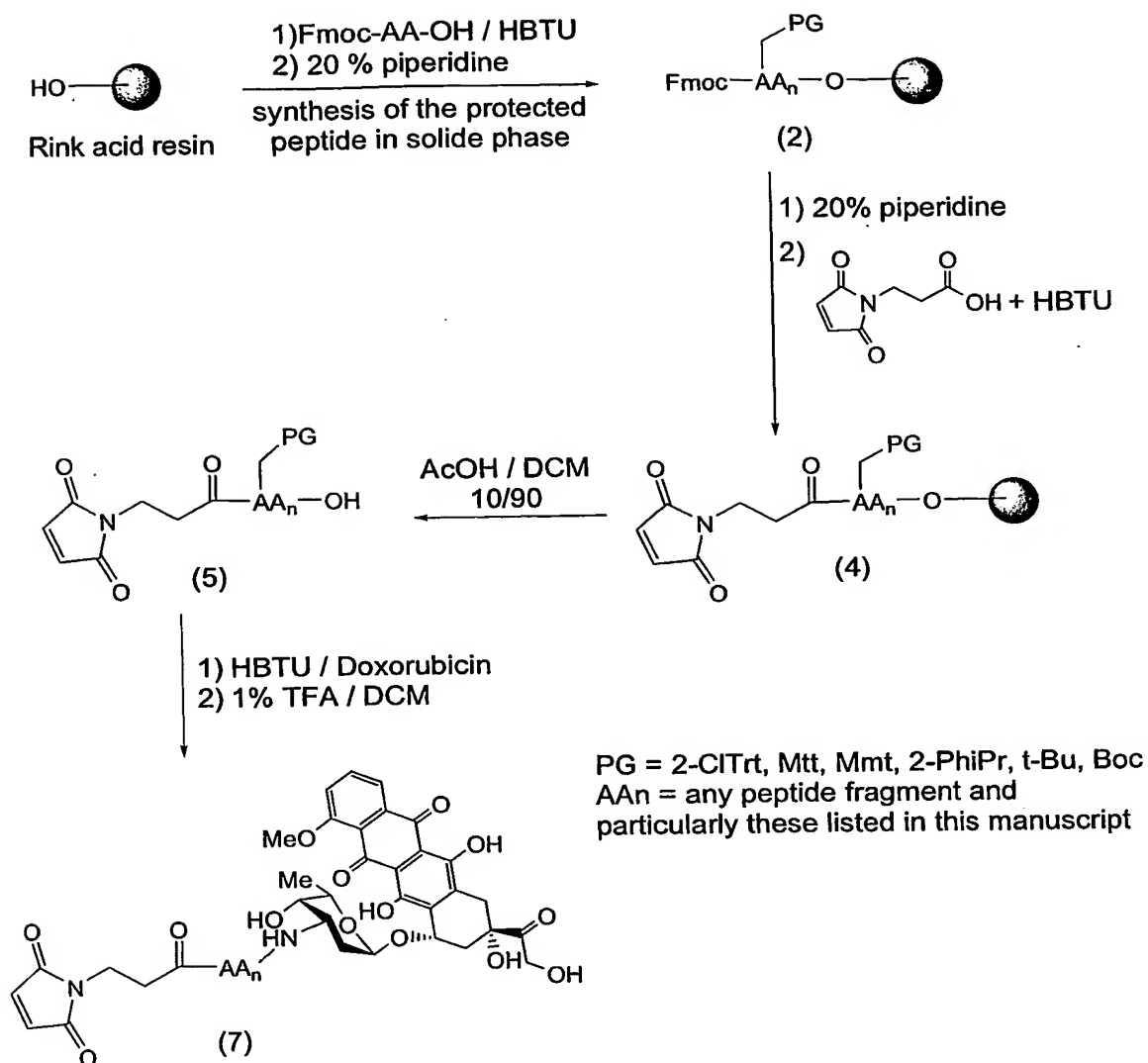


FIGURE 1

2/2

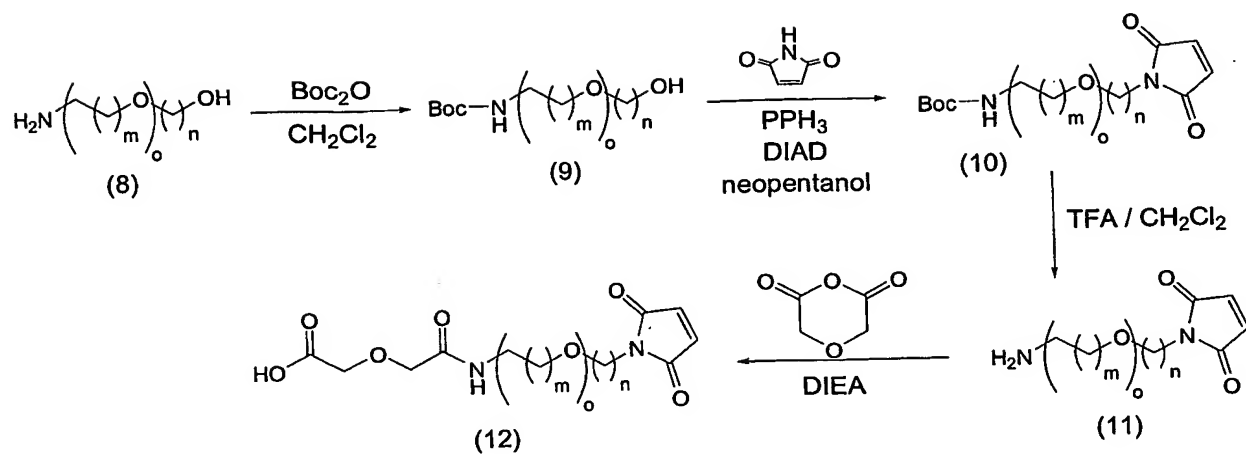


FIGURE 2

IAP9 Rec'd PCT/PTO 08 DEC 2005

1  
SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; BIONEXIS

&lt;120&gt; Molécules de ciblage et de libération de composés thérapeutiques et leur utilisation.

&lt;130&gt; B0204WO

&lt;150&gt; FR 0306944

&lt;151&gt; 2003-06-10

&lt;160&gt; 50

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 156

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

Asp Cys Arg Met Pro Met Gly Leu Ser Thr Gly Ile Ile Ser Asp Ser  
1 5 10 15Gln Ile Lys Ala Ser Glu Phe Leu Gly Tyr Trp Glu Pro Arg Leu Ala  
20 25 30Arg Leu Asn Asn Gly Gly Ser Tyr Asn Ala Trp Ser Val Glu Lys Leu  
35 40 45Ala Ala Glu Phe Ala Ser Lys Pro Trp Ile Gln Val Asp Met Gln Lys  
50 55 60Glu Val Ile Ile Thr Gly Ile Gln Thr Gln Gly Ala Lys His Tyr Leu  
65 70 75 80Lys Ser Cys Tyr Thr Thr Glu Phe Tyr Val Ala Tyr Ser Ser Asn Gln  
85 90 95Ile Asn Trp Gln Ile Phe Lys Gly Asn Ser Thr Arg Asn Val Met Tyr  
100 105 110Phe Asn Gly Asn Ser Asp Ala Ser Thr Ile Lys Glu Asn Gln Phe Asp  
115 120 125

2

Pro Pro Ile Val Ala Arg Tyr Ile Arg Ile Ser Pro Thr Arg Ala Tyr  
 130 135 140

Asn Arg Pro Thr Leu Arg Leu Glu Leu Gln Gly Cys  
 145 150 155

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 156

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Polypeptides construits sur la base de C1F5-S0

&lt;400&gt; 2

Asp Cys Arg Met Pro Leu Gly Met Ser Thr Gly Ile Ile Ser Asp Ser  
 1 5 10 15

Gln Ile Lys Ala Ser Glu Phe Leu Gly Tyr Trp Glu Pro Arg Leu Ala  
 20 25 30

Arg Leu Asn Asn Gly Gly Ser Tyr Asn Ala Trp Ser Val Glu Lys Leu  
 35 40 45

Ala Ala Glu Phe Ala Ser Lys Pro Trp Leu Gln Ile Asp Met Gln Lys  
 50 55 60

Glu Val Ile Ile Thr Gly Ile Gln Thr Gln Gly Ala Lys His Tyr Leu  
 65 70 75 80

Lys Ser Cys Tyr Thr Thr Glu Phe Tyr Ile Ala Tyr Ser Ser Asn Gln  
 85 90 95

Ile Asn Trp Gln Ile Phe Lys Gly Asn Ser Thr Arg Asn Val Met Tyr  
 100 105 110

Phe Asn Gly Asn Ser Asp Ala Ser Thr Ile Lys Glu Asn Gln Leu Asp  
 115 120 125

Pro Pro Ile Val Ala Arg Tyr Ile Arg Ile Ser Pro Thr Arg Ala Tyr  
 130 135 140

Asn Arg Pro Thr Leu Arg Leu Glu Leu Gln Gly Cys  
 145 150 155

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 156

3

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Polypeptide construit sur la base de C1F5-S0

<400> 3

Asp Cys Arg Met Pro Met Gly Leu Ser Thr Gly Ile Ile Ser Asp Ser  
1 5 10 15

Gln Ile Lys Ala Ser Glu Phe Leu Gly Tyr Trp Trp Pro Arg Leu Ala  
20 25 30

Arg Leu Asn Asn Gly Gly Ser Tyr Asn Ala Trp Ser Val Glu Lys Leu  
35 40 45

Ala Ala Glu Phe Ala Ser Lys Pro Trp Ile Gln Val Asp Leu Gln Lys  
50 55 60

Glu Val Ile Ile Thr Gly Ile Gln Thr Gln Gly Ala Lys His Tyr Leu  
65 70 75 80

Lys Ser Cys Tyr Val Thr Glu Phe Tyr Val Ala Tyr Ser Ser Asn Gln  
85 90 95

Ile Asn Trp Gln Ile Phe Lys Tyr Asn Ser Thr Arg Asn Val Met Tyr  
100 105 110

Phe Asn Gly Asn Ser Asp Ala Ser Thr Ile Lys Glu Asn Gln Phe Asp  
115 120 125

Pro Pro Leu Val Ala Arg Tyr Ile Arg Ile Ser Pro Thr Arg Ala Tyr  
130 135 140

Asn Arg Ile Thr Leu Arg Leu Glu Leu Gln Gly Cys  
145 150 155

<210> 4

<211> 156

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Polypeptide construit sur la base de C1F5-S0

<400> 4

Asp Cys Arg Met Pro Met Gly Leu Ser Thr Gly Ile Ile Ser Asp Ser  
1 5 10 15

4

Gln Ile Lys Ala Ser Glu Phe Leu Gly Tyr Trp Glu Pro Arg Leu Ala  
 20 25 30

Arg Leu Asn Asn Gly Gly Ser Tyr Asn Ala Trp Ser Val Glu Lys Leu  
 35 40 45

Ala Ala Glu Phe Ala Ser Lys Pro Trp Leu Gln Ile Asp Leu Gln Lys  
 50 55 60

Glu Val Ile Ile Thr Gly Ile Gln Thr Gln Gly Ala Lys His Tyr Leu  
 65 70 75 80

Lys Ser Cys Tyr Thr Thr Glu Phe Tyr Ile Ala Tyr Ser Ser Asn Gln  
 85 90 95

Ile Asn Trp Gln Ile Phe Lys Gly Asn Ser Thr Arg Asn Val Met Tyr  
 100 105 110

Phe Asn Gly Asn Ser Asp Ala Ser Thr Ile Lys Glu Asn Gln Leu Asp  
 115 120 125

Pro Pro Ile Val Ala Arg Tyr Ile Arg Ile Ser Pro Thr Arg Ala Tyr  
 130 135 140

Asn Arg Pro Thr Leu Arg Leu Glu Leu Gln Gly Cys  
 145 150 155

<210> 5

<211> 150

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 5

Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly His Ile Arg Asp Phe  
 1 5 10 15

Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala  
 20 25 30

Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys Glu Pro  
 35 40 45

Phe Ser Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile Ile His Gly  
 50 55 60

Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser  
 65 70 75 80

Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly<sup>5</sup> Lys Lys Trp Gln Thr Tyr  
 85 90 95  
 Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp  
 100 105 110  
 Ser Ser Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg  
 115 120 125  
 Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg  
 130 135 140  
 Met Glu Leu Met Gly Cys  
 145 150

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 150

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Polypeptide construit sur la base de C1F8-S0

&lt;400&gt; 6

Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Leu Ala Ser Gly His Ile Arg Asp Phe  
 1 5 10 15  
 Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala  
 20 25 30  
 Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys Glu Pro  
 35 40 45  
 Phe Ser Trp Leu Lys Ile Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile Ile His Gly  
 50 55 60  
 Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser  
 65 70 75 80  
 Gln Tyr Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr  
 85 90 95  
 Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp  
 100 105 110  
 Ser Ser Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg  
 115 120 125  
 Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg  
 130 135 140

Met Glu Leu Met Gly Cys  
145 150

<210> 7

<211> 150

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Polypeptide construit sur la base de C1F8-S0

<400> 7

Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Leu Ala Ser Gly His Ile Arg Asp Phe  
1 5 10 15

Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala  
20 25 30

Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys Glu Pro  
35 40 45

Phe Ser Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile Ile His Gly  
50 55 60

Val Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser  
65 70 75 80

Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr  
85 90 95

Arg Tyr Asn Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp  
100 105 110

Ser Ser Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Leu Ile Ala Arg  
115 120 125

Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg  
130 135 140

Met Glu Leu Met Gly Cys  
145 150

<210> 8

<211> 150

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

7

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Polypeptide construit sur la base de C1F8-S0

&lt;400&gt; 8

Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly His Ile Arg Asp Phe  
 1 5 10 15

Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp Trp Pro Lys Leu Ala  
 20 25 30

Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys Glu Pro  
 35 40 45

Phe Ser Trp Leu Lys Ile Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile Ile His Gly  
 50 55 60

Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser  
 65 70 75 80

Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr  
 85 90 95

Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp  
 100 105 110

Ser Ser Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Leu Leu Ala Arg  
 115 120 125

Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg  
 130 135 140

Met Glu Val Met Gly Cys  
 145 150

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 159

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; homo sapiens

&lt;400&gt; 9

Cys Ser Thr Pro Leu Gly Met Glu Asn Gly Lys Ile Glu Asn Lys Gln  
 1 5 10 15

Ile Thr Ala Ser Ser Phe Lys Lys Ser Trp Trp Gly Asp Tyr Trp Glu  
 20 25 30

Pro Phe Arg Ala Arg Leu Asn Ala Gln Gly Arg Val Asn Ala Trp Gln  
 35 40 45

Ala Lys Ala Asn Asn Asn Lys Gln Trp Leu Glu Ile Asp Leu Leu Lys  
 50 55 60

Ile Lys Lys Ile Thr Ala Ile Ile Thr Gln Gly Cys Lys Ser Leu Ser  
 65 70 75 80

Ser Glu Met Tyr Val Lys Ser Tyr Thr Ile His Tyr Ser Glu Gln Gly  
 85 90 95

Val Glu Trp Lys Pro Tyr Arg Leu Lys Ser Ser Met Val Asp Lys Ile  
 100 105 110

Phe Glu Gly Asn Thr Asn Thr Lys Gly His Val Lys Asn Phe Phe Asn  
 115 120 125

Pro Pro Ile Ile Ser Arg Phe Ile Arg Val Ile Pro Lys Thr Trp Asn  
 130 135 140

Gln Ser Ile Thr Leu Arg Leu Glu Leu Phe Gly Cys Asp Ile Tyr  
 145 150 155

<210> 10

<211> 159

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Polypeptide construit sur la base de C2F5-SO

<400> 10

Cys Ser Thr Pro Leu Gly Met Glu Asn Gly Lys Ile Glu Asn Lys Gln  
 1 5 10 15

Ile Thr Ala Ser Ser Phe Lys Lys Ser Trp Trp Gly Asp Tyr Trp Glu  
 20 25 30

Pro Phe Arg Ala Arg Leu Asn Ala Gln Gly Arg Val Asn Ala Trp Gln  
 35 40 45

Pro Lys Ala Asn Asn Asn Lys Gln Trp Leu Glu Val Asp Leu Leu Lys  
 50 55 60

Ile Lys Lys Ile Thr Ala Val Ile Thr Gln Gly Cys Lys Ser Leu Ser  
 65 70 75 80

Ser Glu Met Tyr Val Lys Ser Phe Thr Ile His Tyr Ser Glu Gln Gly  
 85 90 95

Val Glu Trp Lys<sub>100</sub> Pro Phe Arg Leu Lys<sub>105</sub><sup>9</sup> Ser Ser Met Val Asp Lys Ile<sub>110</sub>

Asn Glu Gly<sub>115</sub> Asn Thr Asn Thr Lys<sub>120</sub> Gly His Val Lys<sub>125</sub> Asn Phe Pro Asn

Pro Pro<sub>130</sub> Arg Ile Ser Arg Phe<sub>135</sub> Ile Arg Val Ile Pro<sub>140</sub> Lys Thr Trp Asn

Gln Ser Ile Thr Leu Arg<sub>150</sub> Leu Glu Leu Phe Gly<sub>155</sub> Cys Asp Ile Tyr

<210> 11

<211> 159

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Polypeptide construit sur la base de C2F5-S0

<400> 11

Cys Ser Thr Pro<sub>5</sub> Leu Gly Ile Glu Asn Gly<sub>10</sub> Lys Ile Glu Asn Lys<sub>15</sub> Gln

Ile Thr Ala Ser<sub>20</sub> Ser Phe Lys Lys Ser<sub>25</sub> Trp Trp Gly Asp Tyr Trp Glu<sub>30</sub>

Pro Phe Arg<sub>35</sub> Ala Arg Leu Asn Ala<sub>40</sub> Gln Gly Arg Val Asn<sub>45</sub> Ala Trp Gln

Ala Lys<sub>50</sub> Ala Asn Asn Asn Lys<sub>55</sub> Gln Trp Leu Glu Met<sub>60</sub> Asp Phe Leu Lys

Ile Lys Lys Val Thr Ala<sub>70</sub> Val Ile Thr Gln Gly<sub>75</sub> Cys Lys Ser Leu Ser<sub>80</sub>

Ser Glu Met Tyr<sub>85</sub> Val Lys Ser Phe Thr Ile<sub>90</sub> His Tyr Ser Glu Gln Gly<sub>95</sub>

Val Glu Trp Lys<sub>100</sub> Pro Tyr Arg Leu Lys<sub>105</sub> Ser Ser Met Val Asp<sub>110</sub> Lys Ile

Phe Glu Gly<sub>115</sub> Asn Thr Asn Thr Lys<sub>120</sub> Gly His Val Lys<sub>125</sub> Asn Phe Phe Asn

Pro Pro<sub>130</sub> Ile Ile Ser Arg Phe<sub>135</sub> Ile Arg Gln Ile Pro<sub>140</sub> Lys Thr Trp Asn

Gln Ser Ile Thr Leu Arg<sub>150</sub> Leu Glu Leu Tyr Gly<sub>155</sub> Cys Asp Ile Tyr

10

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 159

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Polypeptide construit sur la base de C2F5-S0

&lt;400&gt; 12

Cys Ser Thr Pro Leu Gly Ile Glu Asn Gly Lys Ile Glu Asn Lys Gln  
1 5 10 15

Ile Thr Ala Ser Ser Phe Lys Lys Ser Trp Trp Gly Asp Tyr Trp Glu  
20 25 30

Pro Phe Arg Leu Arg Leu Asn Ala Gln Gly Arg Val Asn Ala Trp Gln  
35 40 45

Ala Lys Ala Asn Asn Asn Lys Gln Trp Ala Glu Met Asp Leu Leu Lys  
50 55 60

Ile Lys Lys Ile Thr Ala Ile Ile Thr Gln Gly Cys Lys Ser Leu Ser  
65 70 75 80

Ser Glu Met Tyr Val Lys Ser Tyr Thr Ile His Tyr Ser Glu Gln Gly  
85 90 95

Val Glu Trp Lys Pro Tyr Arg Leu Lys Ser Ser Met Val Asp Lys Ile  
100 105 110

Phe Glu Gly Asn Thr Asn Thr Lys Gly His Val Lys Asn Phe Phe Asn  
115 120 125

Pro Pro Ile Ile Thr Arg Phe Ile Arg Val Ile Pro Lys Thr Trp Asn  
130 135 140

Gln Ser Ile Thr Ile Arg Leu Glu Leu Phe Gly Cys Asp Ile Tyr  
145 150 155

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 153

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; homo sapiens

&lt;400&gt; 13

Cys Ser Met Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys<sup>11</sup> Ala Ile Ser Asp Ala Gln  
 1 5 10 15  
 Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro  
 20 25 30  
 Ser Lys Ala Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro  
 35 40 45  
 Gln Val Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr  
 50 55 60  
 Met Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr  
 65 70 75 80  
 Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly His  
 85 90 95  
 Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe Gln Gly  
 100 105 110  
 Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu  
 115 120 125  
 Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile  
 130 135 140  
 Ala Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys  
 145 150

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 153

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Polypeptide construit sur la base de C2F8-S0

&lt;400&gt; 14

Cys Ser Met Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln  
 1 5 10 15  
 Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro  
 20 25 30  
 Ser Lys Ala Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Ala  
 35 40 45  
 Gln Val Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Ile Asp Leu Gln Lys Thr  
 50 55 60

12

Met Lys Ile Thr Gly Ile Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr  
65 70 75 80

Ser Met Tyr Val Lys Glu Tyr Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly His  
85 90 95

Gln Trp Thr Leu Phe Tyr Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe Gln Gly  
100 105 110

Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp Pro Phe Leu  
115 120 125

Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Val Ser Trp Val His Gln Ile  
130 135 140

Ala Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys  
145 150

<210> 15

<211> 153

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Polypeptide construit sur la base de C2F8-S0

<400> 15

Cys Ser Met Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln  
1 5 10 15

Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Lys Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro  
20 25 30

Ser Lys Ala Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Ala  
35 40 45

Gln Val Asn Asn Pro Lys Gln Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr  
50 55 60

Met Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr  
65 70 75 80

Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly His  
85 90 95

Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe Gln Gly  
100 105 110

Phe Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu  
 115 120 125

Leu Thr Ile Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile  
 130 135 140

Ala Leu Arg Met Glu Val Leu Glu Cys  
 145 150

<210> 16

<211> 153

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Polypeptide construit sur la base de C2F8-S0

<400> 16

Cys Ser Met Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln  
 1 5 10 15

Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Lys Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro  
 20 25 30

Ser Lys Ala Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro  
 35 40 45

Gln Val Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr  
 50 55 60

Met Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr  
 65 70 75 80

Ser Met Tyr Val Lys Glu Tyr Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly His  
 85 90 95

Gln Trp Thr Leu Phe Tyr Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe Gln Gly  
 100 105 110

Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp Pro Phe Leu  
 115 120 125

Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile  
 130 135 140

Ala Leu Arg Met Glu Val Leu Glu Cys  
 145 150

<210> 17

14

&lt;211&gt; 86

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; homo sapiens

&lt;400&gt; 17

Thr Lys Ala Ser Cys Lys Val Pro Val Lys Lys Ala Thr Val Val Tyr  
1 5 10 15

Gln Gly Glu Arg Val Lys Ile Gln Glu Lys Phe Lys Asn Gly Met Leu  
20 25 30

His Gly Asp Lys Val Ser Phe Phe Cys Lys Asn Lys Glu Lys Lys Cys  
35 40 45

Ser Tyr Thr Glu Asp Ala Gln Cys Ile Asp Gly Thr Ile Glu Val Pro  
50 55 60

Lys Cys Phe Lys Glu His Ser Ser Leu Ala Phe Trp Lys Thr Asp Ala  
65 70 75 80

Ser Asp Val Lys Pro Cys  
85

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 86

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (2)..(2)

&lt;223&gt; Xaa est Lys, Asp, ou Glu

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (16)..(16)

&lt;223&gt; Xaa est Tyr ou Phe

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (17)..(17)

15

<223> Xaa est Glu ou Gln

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (22)..(22)

<223> Xaa est Lys ou Arg

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (28)..(28)

<223> Xaa est Lys, ou Arg

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (42)..(42)

<223> Xaa est Lys, ou Arg

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (44)..(44)

<223> Xaa est Lys, ou Arg

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (46)..(46)

<223> Xaa est Lys, ou Arg

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (47)..(47)

<223> Xaa est Lys, ou Arg

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (68)..(68)

16

<223> Xaa est Lys, ou Arg

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (77)..(77)

<223> Xaa est Lys, ou Arg

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (84)..(84)

<223> Xaa est Lys, ou Arg

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (49)..(49)

<223> Xaa est Ser ou Thr

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (72)..(72)

<223> Xaa est Ser, Thr ou Met

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa est Leu, Val ou Ile

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> Xaa est Ala ou Met

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (14)..(14)

17

<223> Xaa est Val, Ile, ou Thr

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (15)..(15)

<223> Xaa est Val, Ile, ou Thr

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (21)..(21)

<223> Xaa est Val, Ile, ou Thr

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (23)..(23)

<223> Xaa est Val, Ile, ou Thr

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (37)..(37)

<223> Xaa est Val, Ile, ou Thr

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (27)..(27)

<223> Xaa est Phe ou Tyr

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (40)..(40)

<223> Xaa est Phe ou Tyr

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (54)..(54)

18

<223> Xaa est Ala, Val ou Ile

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (61)..(61)

<223> Xaa est Ile, Val, ou Met

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (67)..(67)

<223> Xaa est Phe ou Tyr

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (73)..(73)

<223> Xaa est Leu, Ile, Phe, Tyr, Met, ou Trp

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (74)..(74)

<223> Xaa est Leu, Ile, Phe, Tyr, Met, ou Trp

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (75)..(75)

<223> Xaa est Leu, Ile, Phe, Tyr, Met, ou Trp

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (76)..(76)

<223> Xaa est Leu, Ile, Phe, Tyr, Met, ou Trp

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (9)..(9)

19

&lt;223&gt; Xaa est Val, Ile ou Thr

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (11)..(11)

&lt;223&gt; Xaa est Lys, ou Arg

&lt;400&gt; 18

Thr Xaa Ala Ser Cys Lys Xaa Pro Xaa Lys Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Xaa  
 1 5 10 15

Xaa Gly Glu Arg Xaa Xaa Xaa Gln Glu Lys Xaa Xaa Asn Gly Met Leu  
 20 25 30

His Gly Asp Lys Xaa Ser Phe Xaa Cys Xaa Asn Xaa Glu Xaa Xaa Cys  
 35 40 45

Xaa Tyr Thr Glu Asp Xaa Gln Cys Ile Asp Gly Thr Xaa Glu Val Pro  
 50 55 60

Lys Cys Xaa Xaa Glu His Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Asp Ala  
 65 70 75 80

Ser Asp Val Xaa Pro Cys  
 85

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 86

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Polypeptide dérivé du domaine 5 des bêta2glycoproéines I

&lt;400&gt; 19

Thr Glu Ala Ser Cys Lys Val Pro Val Lys Arg Ala Thr Val Val Tyr  
 1 5 10 15

Glu Gly Glu Arg Val Arg Ile Gln Glu Lys Phe Lys Asn Gly Met Leu  
 20 25 30

His Gly Asp Lys Val Ser Phe Phe Cys Arg Asn Arg Glu Arg Arg Cys  
 35 40 45

Ser Tyr Thr Glu Asp Ala Gln Cys Ile Asp Gly Thr Ile Glu Val Pro  
 50 55 60

20

Lys Cys Tyr Arg Glu His Ser Met Leu Thr Trp Trp Arg Thr Asp Ala  
 65 70 75 80

Ser Asp Val Lys Pro Cys  
 85

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 86

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Polypeptide dérivé du domaine 5 des bêta2glycoproéines I

&lt;400&gt; 20

Thr Glu Ala Ser Cys Lys Leu Pro Thr Lys Arg Met Thr Val Val Tyr  
 1 5 10 15

Glu Gly Glu Arg Val Arg Ile Gln Glu Lys Phe Lys Asn Gly Met Leu  
 20 25 30

His Gly Asp Lys Ile Ser Phe Phe Cys Arg Asn Arg Glu Arg Arg Cys  
 35 40 45

Ser Tyr Thr Glu Asp Ala Gln Cys Ile Asp Gly Thr Ile Glu Val Pro  
 50 55 60

Lys Cys Tyr Arg Glu His Ser Met Ile Thr Trp Trp Arg Thr Asp Ala  
 65 70 75 80

Ser Asp Val Lys Pro Cys  
 85

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 86

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Polypeptide dérivé du domaine 5 des bêta2glycoproéines I

&lt;400&gt; 21

Thr Lys Ala Ser Cys Lys Val Pro Thr Lys Lys Met Thr Val Val Tyr  
 1 5 10 15

Gln Gly Glu Arg Val Lys Ile Gln Glu Lys<sup>21</sup> Phe Lys Asn Gly<sup>30</sup> Met Leu  
20 25

His Gly Asp Lys Ile Ser Phe Phe Cys Lys Asn Lys Glu Lys Lys Cys  
35 40 45

Ser Tyr Thr Glu Asp Ala Gln Cys Ile Asp Gly Thr Ile Glu Val Pro  
50 55 60

Lys Cys Tyr Lys Glu His Ser Ser Leu Ala Trp Trp Lys Thr Asp Ala  
65 70 75 80

Ser Asp Val Lys Pro Cys  
85

<210> 22

<211> 86

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Polypeptide dérivé du domaine 5 des bêta2glycoproéines I

<400> 22

Thr Lys Ala Ser Cys Lys Val Pro Thr Lys Lys Met Thr Val Val Tyr  
1 5 10 15

Gln Gly Glu Arg Val Lys Ile Gln Glu Lys Phe Lys Asn Gly Met Leu  
20 25 30

His Gly Asp Lys Ile Ser Phe Phe Cys Lys Asn Lys Glu Lys Lys Cys  
35 40 45

Ser Tyr Thr Glu Asp Ala Gln Cys Ile Asp Gly Thr Ile Glu Val Pro  
50 55 60

Lys Cys Tyr Lys Glu His Ser Ser Leu Ala Phe Trp Lys Thr Asp Ala  
65 70 75 80

Ser Asp Val Lys Pro Cys  
85

<210> 23

<211> 75

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

22

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; séquence dérivée d'une annexine humaine

&lt;400&gt; 23

Gly Phe Asp Glu Arg Ala Asp Val Glu Thr Leu Arg Lys Ala Met Lys  
1 5 10 15

Gly Leu Gly Thr Asp Glu Glu Ser Ile Leu Thr Leu Leu Thr Ser Arg  
20 25 30

Ser Asn Ala Gln Arg Gln Glu Ile Ser Ala Ala Tyr Lys Thr Leu Phe  
35 40 45

Gly Arg Asp Leu Leu Asp Asp Leu Lys Ser Glu Leu Thr Gly Lys Phe  
50 55 60

Glu Lys Leu Val Val Ala Leu Leu Lys Pro Ser  
65 70 75

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 75

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; séquence dérivée d'une annexine humaine

&lt;400&gt; 24

Asn Phe Asp Ala Glu Arg Asp Ala Leu Asn Ile Arg Lys Ala Ile Lys  
1 5 10 15

Gly Met Gly Thr Asp Glu Asp Thr Ile Val Gln Ile Leu Thr Asn Arg  
20 25 30

Ser Asn Ala Gln Arg Gln Asp Ile Ala Phe Ala Tyr Gln Arg Arg Thr  
35 40 45

Lys Arg Glu Leu Ala Ser Asp Leu Lys Ser Glu Leu Ser Gly His Leu  
50 55 60

Glu Arg Val Ile Leu Gly Leu Leu Lys Thr Ser  
65 70 75

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 75

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; séquence artificielle

23

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; séquence dérivée d'une annexine humaine

&lt;400&gt; 25

Asp Phe Ser Pro Ser Val Asp Ala Glu Ala Ile Arg Lys Ala Ile Lys  
1 5 10 15

Gly Ile Gly Thr Asp Glu Asp Met Leu Ile Ser Ile Leu Thr Glu Arg  
20 25 30

Ser Asn Ala Gln Arg Gln Leu Ile Val Lys Glu Tyr Gln Ala Ala Tyr  
35 40 45

Gly Arg Glu Leu Lys Asp Asp Leu Lys Ser Glu Leu Ser Gly His Phe  
50 55 60

Glu Arg Leu Met Val Ala Leu Val Thr Pro Ser  
65 70 75

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 75

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; séquence dérivée d'une annexine humaine

&lt;400&gt; 26

Gly Phe Asn Ala Met Glu Asp Val Gln Thr Leu Arg Lys Ala Met Lys  
1 5 10 15

Gly Leu Gly Thr Asp Glu Asp Ala Leu Ile Ser Val Leu Ala Tyr Arg  
20 25 30

Asn Thr Ala Gln Arg Gln Glu Ile Arg Thr Ala Tyr Arg Ser Thr Ile  
35 40 45

Gly Arg Asp Leu Ile Asp Asp Leu Lys Ser Glu Leu Ser Gly Asn Phe  
50 55 60

Glu Arg Val Ile Val Gly Met Leu Thr Pro Ser  
65 70 75

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 75

&lt;212&gt; PRT

24

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; séquence dérivée d'une annexine humaine

&lt;400&gt; 27

Gly Phe Asp Pro Asn Gln Asp Ala Glu Thr Leu Arg Thr Ala Met Lys  
1 5 10 15

Gly Phe Gly Thr Asp Glu Glu Ala Ile Leu Asp Ile Ile Thr Ser Arg  
20 25 30

Ser Asn Arg Gln Arg Gln Glu Val Ser Gln Ser Tyr Lys Ser Leu Tyr  
35 40 45

Gly Arg Asp Leu Ile Ala Asp Leu Lys Ser Glu Leu Thr Gly Lys Phe  
50 55 60

Glu Arg Leu Ile Val Gly Leu Met Arg Pro Ser  
65 70 75

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 75

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; séquence dérivée d'une annexine humaine

&lt;400&gt; 28

Gly Phe Asn Pro Asp Gln Asp Ala Gln Ala Leu Arg Lys Ala Met Lys  
1 5 10 15

Gly Leu Gly Thr Asp Glu Asp Thr Ile Ile Asp Ile Ile Ala His Arg  
20 25 30

Ser Asn Val Gln Arg Gln Glu Ile Arg Gln Ala Phe Lys Ser His Phe  
35 40 45

Gly Arg Glu Leu Met Thr Asp Leu Lys Ser Glu Ile Ser Gly Asp Leu  
50 55 60

Glu Arg Leu Ile Leu Gly Leu Met Met Pro Ser  
65 70 75

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 75

25

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; séquence dérivée d'une annexine humaine

&lt;400&gt; 29

Pro Gly Asp Ala Ile Lys Asp Val Glu Ile Leu Arg Lys Ala Met Lys  
1 5 10 15

Gly Phe Gly Thr Asp Glu Asp Ala Ile Val Asp Ile Val Ala Asn Arg  
20 25 30

Ser Asn Asp Gln Arg Gln Lys Ile Lys Ala Ala Phe Lys Thr Ser Tyr  
35 40 45

Gly Arg Asp Leu Ile Lys Asp Leu Lys Ser Glu Leu Ser Gly Asn Leu  
50 55 60

Glu Arg Leu Ile Leu Ala Leu Phe Met Pro Ser  
65 70 75

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 75

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; séquence dérivée d'une annexine humaine

&lt;400&gt; 30

His Phe Asn Pro Asp Pro Asp Val Ala Ala Leu Arg Lys Ala Met Lys  
1 5 10 15

Gly Ile Gly Thr Asp Glu Asp Ala Ile Ile Asp Ile Leu Thr Ser Arg  
20 25 30

Ser Asn Thr Gln Arg Gln Glu Ile Ala Glu Ser Phe Lys Ala Gln Phe  
35 40 45

Gly Arg Asp Leu Thr Glu Asp Leu Lys Ser Glu Leu Ser Gly Lys Leu  
50 55 60

Glu Arg Leu Ile Val Ala Leu Met Tyr Pro Ser  
65 70 75

&lt;210&gt; 31

26

&lt;211&gt; 75

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; séquence dérivée d'une annexine humaine

&lt;400&gt; 31

Gly Phe Asp Pro Leu Arg Asp Ala Glu Ala Leu Arg Lys Ala Met Lys  
1 5 10 15

Gly Phe Gly Thr Asp Glu Asp Ala Ile Ile Asp Leu Leu Gly Ser Arg  
20 25 30

Ser Asn Lys Gln Arg Gln Gln Ile Leu Leu Ser Phe Lys Thr Ala Tyr  
35 40 45

Gly Arg Asp Leu Ile Lys Asp Leu Lys Ser Glu Leu Ser Gly Asn Phe  
50 55 60

Glu Arg Thr Ile Leu Ala Leu Met Lys Thr Ser  
65 70 75

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 75

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; séquence dérivée d'une annexine humaine

&lt;400&gt; 32

Gly Phe Asp Val Asp Arg Asp Ala Lys Ala Leu Arg Lys Ala Met Lys  
1 5 10 15

Gly Met Gly Thr Asp Glu Asp Ala Ile Ile Glu Ile Leu Thr Ser Arg  
20 25 30

Thr Ser Asp Glu Arg Gln Glu Ile Lys Gln Lys Tyr Lys Ala Thr Tyr  
35 40 45

Gly Arg Glu Leu Glu Glu Asp Leu Lys Ser Glu Leu Ser Gly Asn Phe  
50 55 60

Glu Lys Val Ala Leu Ala Leu Leu Asp Thr Ser  
65 70 75

27

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; homo sapiens

&lt;400&gt; 33

Ala Met Val Ser Glu Phe Leu Lys Gln Ala Trp Phe Ile Glu Asn Glu  
1 5 10 15

Glu Gln Glu Tyr Val Gln Thr Val Lys Ser Ser Lys Gly Gly Pro  
20 25 30

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; peptide dérivé du segment N-terminal de l'annexine I

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (7)..(7)

&lt;223&gt; Xaa est Leu ou Ile

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (8)..(8)

&lt;223&gt; Xaa est Lys ou Asn

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (11)..(11)

&lt;223&gt; Xaa est Trp, Tyr ou Cys

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (12)..(12)

28

<223> Xaa est Tyr ou Phe

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (13)..(13)

<223> Xaa est Ile, Leu ou Met

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (14)..(14)

<223> Xaa est Asp ou Glu

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> Xaa est Glu, Gln, ou Leu

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (19)..(19)

<223> Xaa est Glu, ou Asp

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (20)..(20)

<223> Xaa est Tyr ou Cys

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (21)..(21)

<223> Xaa est Val ou Ile

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (22)..(22)

<223> Xaa est Gln, Lys, Asn, ou Glu<sup>29</sup>

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (23)..(23)

<223> Xaa est Thr, Ser, Cys, Ala

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (24)..(24)

<223> Xaa est Val Thr ou Ser

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (25)..(25)

<223> Xaa est Lys ou Gln

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (26)..(26)

<223> Xaa est Ser, Thr, Cys, ou Gly

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (27)..(27)

<223> Xaa est Ser, Tyr, Val, Gly

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (28)..(28)

<223> Xaa est Lys, His, Ser, ou Pro

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (29)..(29)

30

&lt;223&gt; Xaa est Gly ou Val

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (30)..(30)

&lt;223&gt; Xaa est Gly ou Val

&lt;400&gt; 34

Ala Met Val Ser Glu Phe Xaa Xaa Gln Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Asn Xaa  
 1 5 10 15

Glu Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro  
 20 25 30

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; homo sapiens

&lt;400&gt; 35

Glu Asn Glu Glu Gln Glu Tyr Val Gln Thr Val Lys Ser Ser Lys Gly  
 1 5 10 15

Gly Pro

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 62

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; inhibiteur de TNFR1 dérivé de CRD1

&lt;400&gt; 36

Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser  
 1 5 10 15

Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys  
 20 25 30

Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser  
 35 40 45

31

Phe Thr Ala Ser Glu Asn His Leu Arg His Cys Leu Ser Ser  
50 55 60

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 60

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Inhibiteur de TNFR2 dérivé de CRD1

&lt;400&gt; 37

Pro Gly Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met  
1 5 10 15

Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr  
20 25 30

Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr  
35 40 45

Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Ser  
50 55 60

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; lien clivable

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; SITE

&lt;222&gt; (6)..(7)

&lt;223&gt; site de clivage

&lt;400&gt; 38

Ser Pro Leu Ala Gln Ala Val Arg Ser Ser Ser Arg  
1 5 10

&lt;210&gt; 39

32

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; lien clivable

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; SITE

&lt;222&gt; (5)..(6)

&lt;223&gt; site de clivage

&lt;400&gt; 39

Pro Leu Ala Gln Ala Val Arg Ser Ser Ser  
1 5 10

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; lien clivable

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; SITE

&lt;222&gt; (4)..(5)

&lt;223&gt; site de clivage

&lt;400&gt; 40

Leu Ala Gln Ala Val Arg Ser Ser  
1 5

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; séquence artificielle

&lt;220&gt;

33

&lt;223&gt; lien clivable

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; SITE

&lt;222&gt; (3)..(4)

&lt;223&gt; site de clivage

&lt;400&gt; 41

Ala Gln Ala Val Arg Ser  
1 5

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 4

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; lien clivable

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; SITE

&lt;222&gt; (2)..(3)

&lt;223&gt; site de clivage

&lt;400&gt; 42

Gln Ala Val Arg —  
1

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; lien clivable

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; SITE

&lt;222&gt; (5)..(6)

&lt;223&gt; site de clivage

34

&lt;400&gt; 43

Pro Leu Ala Gln Ala Val Arg Ser  
1 5

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; lien clivable

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; SITE

&lt;222&gt; (3)..(4)

&lt;223&gt; site de clivage

&lt;400&gt; 44

Ala Gln Ala Val Arg Ser Ser  
1 5

&lt;210&gt; 45

&lt;211&gt; 56

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; oligonucléotide NTA1c+

&lt;400&gt; 45

cgaaaacgaa gaacaggaat acgttcagac cgtaaatact tctaaagggtg gtccgg

56

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 64

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; oligonucleotide NTA1c-

35

<400> 46  
gatcccggac cacctttaga agatttaacg gtctgaacgt attcctgttc ttcgttttcg 60  
ggcc 64

<210> 47

<211> 95

<212> DNA

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> oligonucléotide NTA11+

<400> 47  
cgctatgggt tctgaattcc tgaaacaggc ttggttcacg gaaaacgaag aacaggaata 60  
cgttcagacc gttaaattctt ctaaagggtg tccgg 95

<210> 48

<211> 103

<212> DNA

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> oligonucléotide NTA11-

<400> 48  
gatcccggac cacctttaga agatttaacg gtctgaacgt attcctgttc ttcgttttcg 60  
atgaaccaag cctgtttcag gaattcagaa accatagcgg gcc 103

<210> 49

<211> 30

<212> DNA

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> oligonucléotide Ban II +

<400> 49  
gcgctgtag cgggtccatt aagttctgtc 30

<210> 50

<211> 30

<212> DNA

36

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; oligonucléotide Ban II -

&lt;400&gt; 50

gacagaactt aatggacccg ctaacagcgc

30

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**